



TITLE:

ウシ卵子の体外受精及び体外受精
胚の凍結保存に関する研究(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

福島, 護之

CITATION:

福島, 護之. ウシ卵子の体外受精及び体外受精胚の凍結保存に関する研究. 京都大学, 1992, 博士(農学)

ISSUE DATE:

1992-03-23

URL:

<https://doi.org/10.11501/3088605>

RIGHT:

ウシ卵子の体外受精及び体外受精胚の
凍結保存に関する研究

1991

福島護之

目 次

第1章 緒 論 ----- 1

第2章 ウシ卵母細胞の体外成熟に影響する培養環境条件の検討

第1節 緒言 ----- 7

第2節 ウシ卵母細胞の成熟培地へのゴナドトロピンとestradiol-17 β の添加が成熟とその後の胚発生に及ぼす影響 ----- 9

第3節 培養温度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響 --- 22

第4節 酸素濃度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響 --- 31

第5節 小括 ----- 42

第3章 ウシ体外受精における種雄牛個体による受精率の差異と精子前培養時のHeparin
およびCaffeineの体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響

第1節 緒言 ----- 45

第2節	体外受精における受精率と胚発生率の種雄牛個体による差異	47
第3節	ウシ精子前培養時のHeparinおよびCaffeineの添加が体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響	55
第4節	小括	71
第4章	ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存	
第1節	緒言	72
第2節	体外受精後、体外および家兎卵管内で培養されたウシ胚盤胞の耐凍性の検討	73
第3節	冷却速度および液体窒素浸漬温度がウシ体外受精・体外培養胚盤胞の生存性と受胎性に及ぼす影響	79
第4節	凍結・融解したウシ体外受精・体外培養胚盤胞のストロー内glycerol除去の検討	93
第5節	小括	101

第5章 総 括 - - - - - 103

謝辞 - - - - - 108

文献 - - - - - 109

英文抄録 - - - - - 119

第 1 章 結 論

近年、体外受精に関する研究は急速に進んでいる。その成果が研究面では 1) 哺乳動物の生殖生理、特に受精機構や初期発生要因の解析を可能にし、2) これまで入手が困難であった受精直後の前核期など初期胚を多数かつ安定的に供給できるので、遺伝子移植やクローニングなど生物工学的手法への利用を可能にした。

一方、体外受精の畜産現場への応用的利用については、以下の 4 点が考えられるようになった。1) 単に肉用牛の増産のみでなく、枝肉成績の明らかな雌牛の卵巣を利用することによって付加価値の高い肉用牛の肥育素牛および繁殖素牛の生産が可能となる。繁殖素牛を生産するには登録規定の変更が前提となるが、肉質の優れた系統の作出に貢献できる。2) 種雄牛の間接検定材料牛を確保できる。3) 体外受精では 1 本の凍結精液ストローで 10～20 頭の子牛を生産することが可能であり、優良種雄牛の精液を有効に利用できる。4) 特定の優良雌ウシが急死したり切迫屠殺される場合にこれらの子孫を残して、遺伝資源の保存が可能となった。

歴史的には、ウシ体外受精における基礎研究は、ウシ精子の卵母細胞への侵入を体外で証明した、Iritani and Niwa(1977)によって始まったといっても過言ではない。Iritani and Niwa(1977)は、培地内で 12～14 時間前培養の 0% に比べて、発情雌ウシから摘出した子宮または卵管内で 3～4 時間および発情雌家兎の生体子宮内で 12～14 時間それぞれ前培養した精子を修正 KRB 液で 20～24 時間培養した卵母細胞と授精し、18～21 時間後に検査した結果、それぞれ 18.5、20.7 および 21.3% の卵子に明確な精子侵入が認められたと述べている。その後、後述するような生体外での精子処理によって受精が証明され、次いで初期胚が得られた。その後、ヒツジ卵管内または家兎卵管内や体外で体外受精胚を培養する実験系が確立され、胚盤胞が得られた。さらに、これらの胚盤胞を性周期を同期化した受胎牛へ移植して子牛が生産されるようになっている(花田ら;1986,Critser et al.;1986、Sirard and Lambert;1986、Lu et al.;1987、湊;1989、Utsumi et al.;

1991)。

一方、体外受精に用いる卵子については過剰排卵処理して体内で成熟した卵胞卵子または排卵卵子を用いる実験が中心に進められた。体外で成熟したウシ卵母細胞の発育能に関する研究は、1978年にNewcomb et al.が行った実験に始まる。Newcomb et al.(1978)は、体外で発育した卵母細胞を予め人工授精しておいた雌ウシの排卵の反対側の卵管へ外科的に移植した。そして、7日後に採卵して、胚盤胞に発育した2個の胚を発情の8日目の受胎牛に移植して正常な双子を得ている。その後、体外受精の実験では、過剰排卵処理後の体内で成熟した卵母細胞を体外で受精し、産子を得たという報告が多かった(Brackett et al.;1982、Shirard and Lambert;1986)。しかし、1986年に花田らとCristser et al.(1986)が体外成熟した卵母細胞を体外で処理した精子との体外受精で得た胚を家兎あるいはヒツジ卵管で胚盤胞まで発生させた後、非外科的な移植で受胎、妊娠例を報告した。この報告の後、梶原ら(1987)、Goto et al.(1988)、Lu et al.(1988)、Fukui and Ono(1989)、Gordon and Lu(1990)、Fukui(1990)、Fukuda et al.(1990)他多くの研究者によって成熟、受精、培養の過程を完全に体外で行い、胚盤胞を得る実験系が報告されるに至った。

体外受精の過程は、1)卵母細胞の成熟、2)精子前培養と授精および3)受精卵の初期発生の3つの段階に分けられる。さらに得られた胚の効率的な利用を考えると、胚の凍結を合わせた計4つの過程よりなると思われる。

卵母細胞の成熟については、Erickson(1966)によるとウシ卵巣中には8～20万個の卵母細胞が存在しているが、そのうち成長中の卵胞が150～250個、小胞を形成している卵胞でも変性過程にない正常な卵母細胞は10～35個と報告されている。Edwards(1965)は、このうち2～5mm以下の小胞中に含まれるウシの卵母細胞を体外で培養することにより第2減数分裂中期まで発育することを早くから確認していた。しかし、卵母細胞の核のみでなく細胞質を含めた成熟の判定を行う場合には、受精させてその後の胚発生によって初めてその判定が可能となる。Newcomb et al.(1978)によって体内で受精能獲得した精子

との受精により体外成熟した卵母細胞も個体へ発生する能力を持つことは証明されたが、詳細な研究は行われなかった。Shea et al.(1976)、佐藤ら(1977)やFukui et al.(1985)により受精までの成熟条件の検討は散見されたが、体外成熟した卵母細胞はMPGF（雄性前核形成因子）の産生が不十分であるというThibault(1975)の考え方が主流をしめており、研究数も少なかった。ヒツジにおいてはMoor and Trounson(1977)が卵胞培養法を用いた実験系で成熟条件を詳細に検討し、その後、人工授精したヒツジ卵管へ体外成熟させた卵母細胞を移植して受精後の発生能を検討しているが、ウシにおいては基礎研究は進展しなかった。前述のように花田ら(1986)やCritser et al.(1986)が体外成熟した卵母細胞を用いた体外受精で産子を得て、その発生能を証明するまでは十分な検討は少なかった。そのため、成熟後の精子侵入、前核形成を含めた受精能や受精後の初期発生、着床後の発育を含めた発生能にまで及んだ基礎的な体外成熟条件の解明が必要であった。

精子の受精能獲得とそれに続く先体反応の誘起に関しては、体外受精率を高くし、受精の時期を適正に操作でき、精子侵入後の雌雄両前核が同期化している正常な受精を誘起できる精子前培養法および処理法の解明が必要である。体外で正常な受精像が確認されたのは、Iritani and Niwa(1977)の家兎卵管またはウシ卵管内での前培養による受精能獲得誘起法であった。その後、化学的に組成の明確な培地を用いた実験系の開発が望まれたが、Brackett et al.(1982)は高イオン強度培地での前培養により受精例を報告し、体内成熟卵母細胞との受精で産子を得た。続いて、比較的高濃度で精子前培養処理する(Iritani et al.;1984)方法やIonophore A-23187に感作（花田;1985）、Caffeineに感作(Shioya et al.;1988)およびムコ多糖類の1つであるHeparinに感作させる(Parrish et al.;1985)ことなどにより受精が証明されるようになった。また、それらのうちCaffeineやHeparinの併用によって受精率が上昇することが報告される(Niwa and Ohgoda;1988)と共に、精子に対する各処理の機構が種々の動物を用いて解明され始めた(Fraser;1979、Handrow et al.;1982、Parrish et al.;1985、Fraser;1987、Jones et al.;1980、Leclerc et al.;1990、Miller et al.;1990、Hurst et al.;1988)。しかし、これらの薬剤処

理による受精能獲得は生理的条件との関係は明らかにされておらず、生理的变化との関係におけるそれらの薬剤の関係を明らかにする必要がある、しかも特定の種雄牛を用いて体外受精を行う場合に必ずしも良好な受精率や発生率が得られないことがあり、適切な精子前培養条件や受精条件を確立する必要がある。

得られた体外受精胚を体外で発生させることは困難で、初期の頃は家兎卵管内やヒツジ卵管内を利用した。しかし、生体内を利用した実験系では、使用した動物の個体による差や移植手技における胚の損失などがあり、不安定な実験系であった。そこで、卵管内の環境を整えつつ体外で再現性の高い実験系の開発が望まれた。まず、梶原ら(1987)やFukuda et al.(1990)の卵丘細胞の単層細胞との共培養による実験系が報告された。これらの実験系での胚盤胞への発生率は4~25%であり、受精率が90%以上であることを考えるとかなりの胚が発生停止していた。その後、卵管や子宮の上皮細胞および線維芽細胞の単層細胞との共培養による培養結果が報告されている(Lu et al.;1988, Fukui and Ono;1989)が、卵丘細胞の結果と同程度の発生率であった。体外培養により得られた胚盤胞の細胞数は、68.2個と供胚牛より回収された胚盤胞と比較するとやや少なく(梶原ら;1988a)、さらに、内部細胞塊(ICM)を形成する細胞数が有意に少なく、細胞の染色性も供胚牛から回収された胚盤胞と異なることが報告されている(Iwasaki et al.;1990a)。そこで、培養条件の改善によって質の高い胚を作出することが必要である。

ウシ体外受精・体外培養胚の作出例は近年急激に増加し、その移植、出産例も報告されているが(梶原ら;1987,Goto et al.;1988, Lu et al.;1988, 湊;1989, Fukuda et al.;1990, Gordon and Lu;1990)、作出された胚を移植する場合に受胚牛を一度に多数揃えることは困難である。実際に体外受精胚を研究材料や肉牛生産等に利用していくには、胚の安定した凍結保存技術が望まれる。しかし、ウシ体外成熟・体外受精卵の体外培養による胚盤胞への発生の成功(梶原ら;1987、Fukuda et al.;1990)から歴史が浅く、その凍結保存に関する研究も少ない。これまで報告された凍結融解後の生存率は高くても70%前後である(梶原ら,1988b;米谷ら,1989)。一方、体外受精卵を家兎卵管内に仮移植

することによって得られた胚盤胞は、供胚牛から回収した胚盤胞と同程度の凍結融解後の生存性を得ており(Utsumi et al.;1991)、体外受精後の培養条件によって胚の耐凍性が左右されることが考えられる。しかしながら、これまでにウシ体外受精・体外培養胚盤胞の耐凍性を供胚牛から回収した胚盤胞のそれと比較して、その特性を明らかにした報告はない。また、これを凍結保存する場合の最適凍結曲線を詳細に検討した報告はない。そこで、これらの胚を効率的に利用するために、受胎性の高い胚の凍結保存技術を確立し、現在の体外受精・体外培養で作出される胚盤胞に対して最適の凍結条件を検討しておく必要がある。

このように、ウシの体外受精はここ10年余りの間に急速に知見が集積され、比較的容易に移植可能な胚盤胞が得られるようになった。しかし、体外受精を実施するにあつては、種雄牛によって受精率が安定せず、発生率は培養胚の20%と低く、得られた胚盤胞の品質は供胚牛から採卵された胚に比較しても低い(Iwasaki et al.;1990a)。発生率には成熟条件および受精において精子との同期化がその発生能に影響していると考えが、成熟条件および受精条件が発生能に対する影響を明らかにした研究は少ない。また、体外受精胚盤胞の凍結に対する抵抗性も明らかではない。そこで、体外受精の各過程が胚の発生および胚の凍結に対する影響を明らかにして、これらの問題点を解決する必要がある。

ウシ体外受精・体外培養胚の効率生産とそれに関係する要因を明らかにするために第2章ではウシ卵母細胞の体外成熟に影響する培養環境条件について、ウシ卵母細胞の成熟培地へのゴナドトロピンとestradiol-17 β の添加が成熟およびその後の胚発生に及ぼす影響ならびに培養温度と酸素濃度がウシ卵母細胞の成熟およびその後の胚発生に及ぼす影響を検討し、第3章ではウシ体外受精における種雄牛個体による受精率の差異と精子前培養時のHeparinおよびCaffeineの精子受精能に対する影響を明らかにした。最後に、第4章ではウシ体外受精由来胚盤胞を凍結保存するために、体外受精後、体外および家兎卵管内で培養されたウシ胚盤胞の耐凍性を比較した後、冷却速度および液体窒素浸漬

温度がウシ体外受精・体外培養胚盤胞の生存性と受胎性に及ぼす影響を調べた。さらに、
野外での移植を実施するために凍結・融解したウシ体外受精・体外培養胚盤胞のストロ
ー内glycerol除去を検討して簡易な移植法を開発した。

第2章 ウシ卵母細胞の体外成熟に影響する 培養環境条件の検討

第1節 緒言

哺乳動物の卵母細胞はその個体の胎児期以後、第1減数分裂前期で发育を中止している。これらの体外における成熟については、多くの動物種で研究されている（Pincus and Enzmann; 1935, Edward; 1965）。ウシにおいても体内とほぼ同様の時間的経過で卵子の成熟が進行すること（佐藤ら; 1978, Fukui et al.; 1985）、体外受精すると胚盤胞へ発生すること、さらに受胎牛に移植すると受胎、分娩することがそれぞれ報告されている（花田ら; 1986, Critser et al.; 1986, Lu et al.; 1987, Xu et al.; 1987a）。

しかし、体外受精したウシ卵母細胞の単精子侵入率は80%を越えているが、2細胞期以上への分割率は60～70%、授精48時間後の4細胞期以上発生率は50%前後に低下することが報告されている（花田; 1986, Lu et al.; 1988, 梶原ら; 1987）。さらに、家兎結紮卵管内培養あるいは、体外培養によっても胚盤胞への发育率は10～30%にまで低下する（花田ら; 1986, 梶原ら; 1987）。Leibfried et al. (1987) は、体内成熟卵では体外受精後に胚盤胞が得られるが、体外成熟卵では、胚盤胞を得られなかったことから、初期胚への発達能は、体内成熟卵にのみ付与されると結論づけた。しかし、現在では体外培養のみで胚盤胞を得られる実験系ができたが、80%を越える単精子侵入率でありながら4細胞期胚までに50%が退行していくことを考えると、原因の1つとして卵母細胞の不十分な成熟条件があげられている。

本章では、ウシ卵母細胞の体外成熟条件を改善して成熟およびその後の胚発生の良好な成熟培養条件を確立するために、第2節でウシ卵母細胞の成熟培養時に培養液へのゴナドトロピンとestradiol-17 β の添加が体外受精およびその後の胚発生率に及ぼす影響を検討した。次に、第3節で培養温度が卵母細胞の成熟と発生に及ぼす影響について、

さらに第4節では培養の酸素濃度が卵母細胞の成熟と発生に及ぼす影響について検討した。

第2節 ウシ卵母細胞の成熟培地へのゴナドトロピンとestradiol-17 β の添加が

成熟とその後の胚発生に及ぼす影響

Thibault et al.(1975)は、体外成熟培地へのゴナドトロピンおよびステロイドホルモンの添加が、その後の受精ならびに受精卵の発生に有効であると述べている。また、Moor and Trounson(1977)は、ヒツジの卵胞培養で、成熟培地へホルモンを添加することによって、多数の胚盤胞が得られたことを報告している。一方、Eppig(1980)は、ゴナドトロピン(FSH)の添加は、マウス卵丘細胞の膨潤には効果があるが、卵母細胞の成熟およびその後の発生能に影響を及ぼさないことを明らかにしている。さらに、Schroeder and Eppig(1984)は、マウス卵母細胞をゴナドトロピンおよびステロイドホルモンを添加しない培地で体外成熟させた場合でも、正常に受精して胚盤胞、産子へ発生することを報告している。花田ら(1985b)はウシにおいて、成熟培地へのホルモンの添加がその後の前核形成能に影響を及ぼさないことを明らかにしている。

本節では、ウシ卵母細胞の成熟培地へのゴナドトロピンおよびestradiol-17 β (以下E₂とする)の添加が、その後体外受精卵の発生能ならびに受胎牛に移植後の産子への発育能に影響するか否かを検討した。

I 材料と方法

1 卵母細胞の体外培養

ウシ卵巣は、屠場で屠殺後30分以内に採取し、37℃に保温した滅菌生理食塩水中にプールして実験室に持ち帰った。卵巣表面の直径2～5mmの小卵胞に18Gの注射針を刺して卵胞液とともに卵母細胞を5ml注射器で吸引採取した。卵母細胞は修正Dulbeccoリン酸緩衝液で洗浄した後、緊密な卵丘細胞層に包まれた卵母細胞を選別して体外成熟培地に入れた。卵母細胞の成熟基礎培地には、10%非働化牛胎児血清(以下FCSとする、GIBCO)、

抗生物質を添加した25mMヘブス緩衝TCM-199(GIBCO)を用い、ホルモンを加えないA区、黄体形成ホルモン（以下LHと略す：10 μ g/ml、BURNS-BIOTEC）とE₂（1 μ g/ml、Sigma）を含むB区、B区に卵胞刺激ホルモン（以下FSHと略す、デンカ製薬）を2 μ g/mlおよび10 μ g/mlを添加したC区およびD区の4区を設定した。なお、E₂は、エタノールで1mg/mlとなるように調製したものをストック液とした。また、本実験で使用したLH、FSHおよびE₂濃度は、Fukui et al.(1983)の報告を基準に設定した。各成熟培地を35mmシャーレ(Falcon)内で100 μ lの小滴にして滅菌流動パラフィンで覆い、39℃、5%CO₂、95%空気的气氛相下の加湿型炭酸ガス培養器内で22時間成熟培養を行った。

2 精子処理と体外受精（授精）

茨城県畜産試験場より供与された1頭の種雄牛の凍結精液を実験に供した。2～3本の0.5mlストロー凍結精液を37℃の温湯中で融解し、小試験管内でウシ血清アルブミンを除いた修正タイロード液（B0液、Table 2-1、Brackett and Oliphant;1975）に10mM caffeine（安息香酸ナトリウムcaffeine中のcaffeineを50%として計算、Sigma）を加えた液（Caf-B0液）で精子を2回洗浄（500×G、5分間）した。洗浄後、精子濃度をCaf-B0液で25×10⁶精子/mlに調整し、ウシ血清アルブミン（Sigma）を20mg/ml添加したB0液（BSA-B0液）で精子浮遊液を等倍希釈した。BSA-B0液で希釈した精子浮遊液を100 μ lの小滴にして滅菌流動パラフィンで覆い、炭酸ガス培養器内で5時間ブレインキュベーションした。授精は、成熟培養に供試した全ての卵子をBSA-B0液で洗浄し、精子浮遊ドロップ中に入れて行った。

3 体外受精後の発生

授精の6時間後に卵子を発生培地に移し換えた。発生培地には25mMヘブス緩衝TCM-199に10%非働化去勢牛血清、0.5mMビルビン酸ナトリウム、3.7 μ l/ml乳酸ナトリウム（60%シロップ、Sigma）および抗生物質を添加して使用した。一部の卵子を授精10～18時間

Table 2-1. Composition of Brackett and Oliphant medium (B0)

Components	mM	Weight(g)/l
NaCl	112.00	6.550
KCl	4.02	0.300
NaH ₂ PO ₄ 2H ₂ O	0.82	0.182
NaHCO ₃	37.00	3.104
CaCl ₂ 2H ₂ O	2.25	0.330
MgCl ₂ 6H ₂ O	0.52	0.106
Glucose	13.90	2.500
Na pyruvate	1.25	0.138
Bovine serum albumin	-	3.000

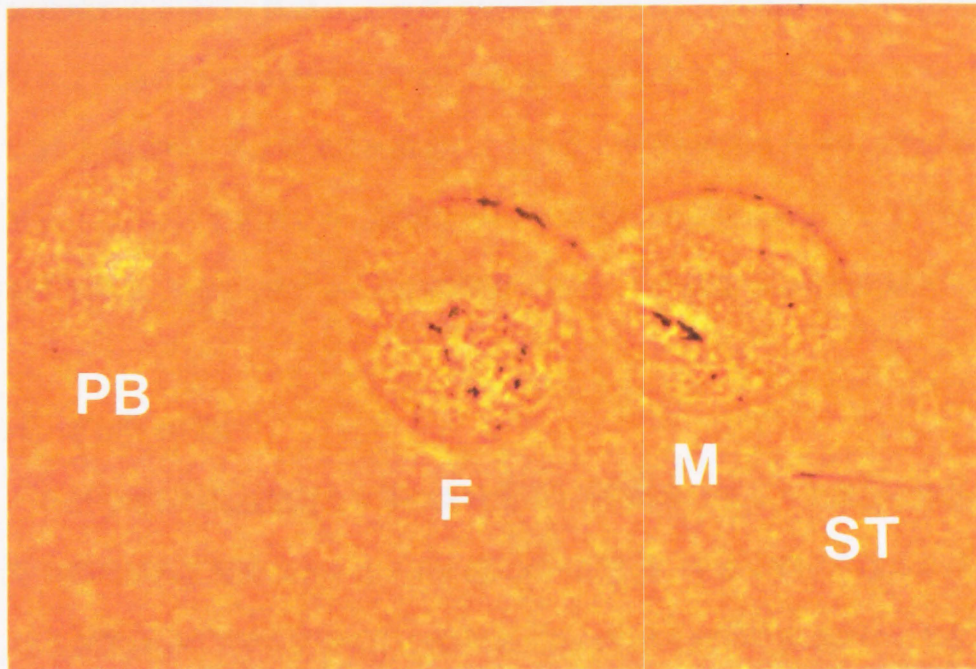


Fig. 2-1. Early stage of fertilization in vitro of bovine follicular oocytes
An oocyte fixed 12h after insemination. Female (F) and male (M) pronuclei,
detached sperm tail (ST) and 2nd polar body (PB) can be seen. $\times 400$.

後に抜き取り、ホルマウント標本にして、精子尾部を伴った雌雄両前核の存在により受精を判定し(Fig. 2-1)、受精率を検査した(Shioya et al.;1988)。授精の50時間後に卵丘細胞層を除去し、胚の発生段階を検査した。このうち4細胞期以上に分割した胚を偽妊娠家兎卵管内に移植し、その後の発生能を検討した。体重3.5~4.0kgの日本白色種家兎に、移植の53~54時間前に80IUヒト胎盤性性腺刺激ホルモン(HCGモチダ、持田製薬K.)を静脈注射して、偽妊娠を誘起した。卵管、子宮接合部を結紮した後に胚を卵管内約15mmヘビペットで移植した。移植後114~115時間目に卵管を摘出し、下降性に灌流して胚を回収し、発生培地でさらに24時間体外培養して胚盤胞への発生を検討した。

4 胚盤胞の移植

各区で得られた胚盤胞を8頭の受胎牛に非外科的に移植して受胎性を検討した。受胎牛は畜産試験場繋養のホルスタイン種(未経産2頭、初産4頭、2産および4産各1頭)で、自然発情の7または8日目に新鮮胚または富永ら(1985)の方法により凍結した胚を各受胎牛に2~3個ずつ移植した。このうち、5頭については発情時に人工授精を施した後に胚移植を実施する重ね移植を行った。

受精率および胚発生率については、 χ^2 検定を行って有意差の有無を検討した。

II 結果

授精後10~18時間後の抜き取り検査における卵子の受精率はTable 2-2に示したように、88.2~90.9%であり各区間に有意差は認められなかった。また、成熟培養終了時点における卵丘細胞膨潤の状態は、A区と他区の間でその程度が異なり、A区では他の区ほど明らかな膨潤がみられなかった(Fig. 2-2)。

授精50時間後に4細胞期以上に発生していた胚の割合をTable 2-3に示した。このうちA区とC区間で有意差($P<0.05$)が認められた。

Table 2-2. Effects of gonadotropins and estradiol-17 β in maturation medium on subsequent capacity for in vitro fertilization of bovine oocytes

Treat- ment	LH (μ g/ml)	FSH (μ g/ml)	E ₂ (μ g/ml)	No. of trials	No. of oocytes			
					Examined	M-II	Fertilized(%)	Polyspermy
A	-	-	-	5	44	4	40 (90.9)	3
B	10	-	1	6	51	6	45 (88.2)	7
C	10	2	1	6	47	5	42 (89.4)	5
D	10	10	1	6	43	4	39 (90.7)	4

Oocytes were cultured for 22 hours in an incubator at 39 °C under 5% CO₂ in air. The medium used for oocyte culture was 25mM HEPES buffered TCM-199 with Earl's salts (Gibco,U.S.A.) containing 10% (v/v) fetal calf serum(FCS). Final sperm concentration was at 12.5 \times 10⁶ cells / ml. Oocytes were examined 10-18h after insemination.

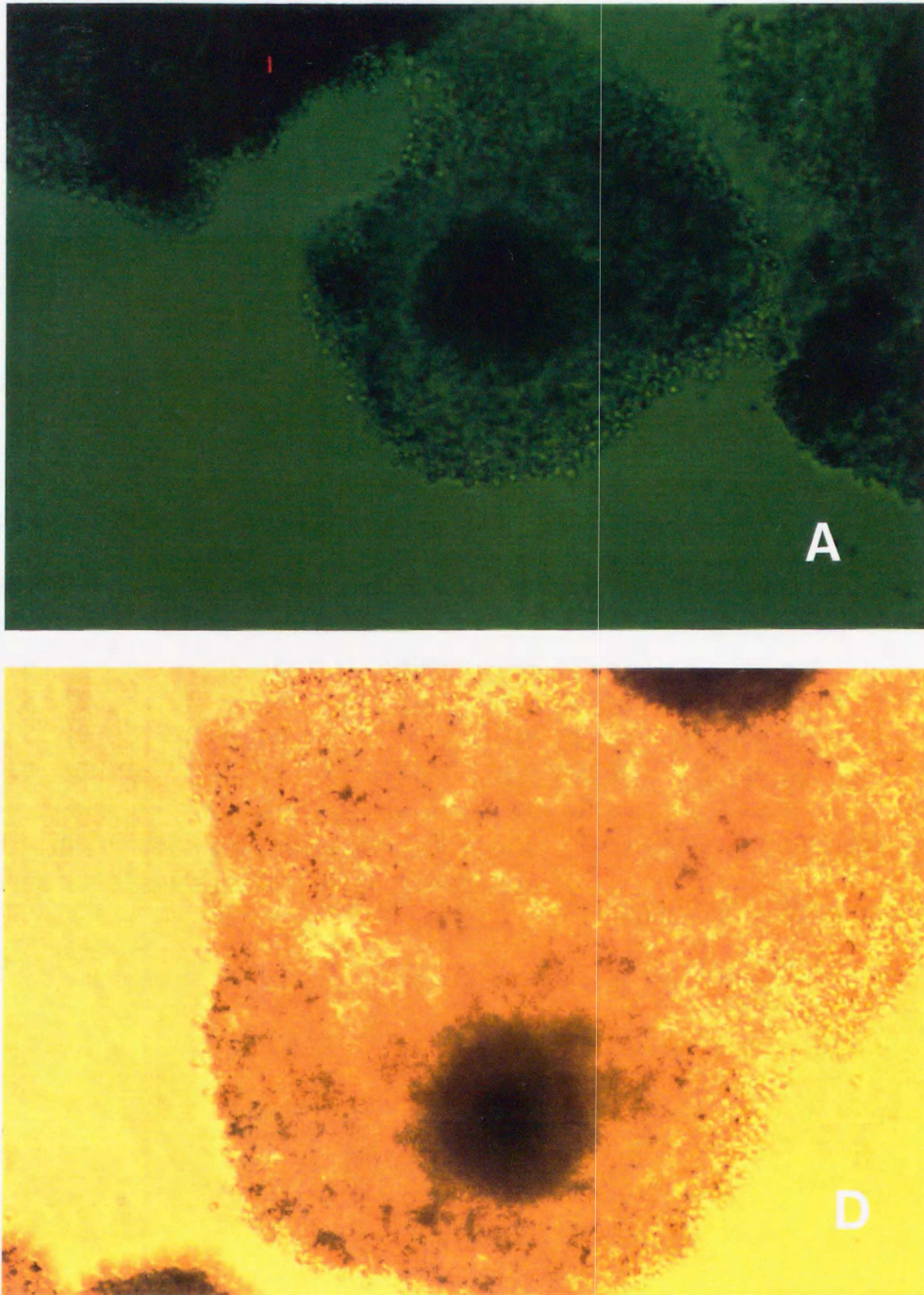


Fig. 2-2. Bovine ovarian oocytes with expanded cumulus cell masses following culture for 22hr in TCM-199 without hormone(group A) and with hormones(group D).

Table 2-3. Effects of gonadotropins and estradiol-17 β supplemented into maturation medium on subsequent maturation and development in vitro of bovine oocytes

Treat- ment	LH	FSH	E ₂	No. of trials	No.(%) of eggs		
					Examined	2-cell<	4-cell<
A	-	-	-	6	326	196 (60.1)	122 (37.4) ^a
B	10	-	1	6	328	165 (49.8)	103 (31.4) ^{a, b}
C	10	2	1	6	343	166 (48.4)	102 (29.7) ^b
D	10	10	1	6	343	177 (51.6)	122 (35.6) ^{a, b}

a,b:The different superscripts are significantly different (P<0.05). Eggs were examined 50 h after insemination.

偽妊娠家兎卵管内培養によるウシ体外受精胚の胚盤胞期への発生率はTable 2-4に示すとおりであった。各区とも偽妊娠家兎卵管からの卵回収率は82.8～94.3%であった。また、回収卵に対する胚盤胞の割合（34.7～49.3%）は各区間で有意差が認められなかった。

それぞれの区から得られた胚盤胞の一部を受胎牛に移植したところ、A区で4頭中1頭、CとD区で3頭中3頭が31.5～51.0kgのそれぞれ正常な産子を出産した（1986年8月～9月）（Table 2-5）。受胎牛245号および275号は、重ね移植により妊娠したが、これらから得られた産子は人工授精由来のホルスタイン種であった。受胎牛247号は双子を分娩したが、1頭は胚移植による黒毛和種×ホルスタイン種の交雑種で、1頭は人工授精由来のホルスタイン種であった。

Ⅲ 考察

これまで、卵胞外で成熟した卵母細胞は細胞質の成熟が不完全であるため(Moor and Trounson;1977)、正常な雄性前核形成能を誘起するには成熟培地へのホルモン(プロラクチン、テストステロン)を添加することが必要であるとされている(Thibault et al.;1975)。一方、Iritani and Niwa(1977)、Iritani et al.(1984)は、ホルモン無添加の修正Krebs-Ringer-bicarbonate培地で成熟させた卵母細胞を用いて、正常な雌雄両前核が形成されることを観察している。さらに花田ら(1985)は、ホルモン(LH, E₂)を添加しても、雄性前核形成能に対して特に効果がないと述べている。今回の成績は、後二者の成績と同様であり、体外成熟培地にホルモンを添加しない場合でも卵子の雄性前核形成能には影響しないことを示唆した。

Eppig(1980)は、成熟培地へのFSHの添加が、マウス卵丘細胞の膨潤に有効であったと述べているが、卵丘細胞の膨潤は卵子の成熟にとって必須の条件ではないとしている。今回のウシにおける実験結果でも、ホルモン無添加区の卵丘細胞の膨潤が他の区に比較

Table 2-4. Effects of gonadotropins and estradiol-17 β supplemented into maturation medium on the subsequent development into blastocysts of in vitro fertilized bovine embryos

Treat- ment	LH	FSH	E ₂	No. of Recovered embryos/ trials transferred embryos		No.(%) of embryos developed to blastocysts	
A	-	-	-	6	101/122	40	(39.6)
B	10	-	1	5	75/ 84	37	(49.3)
C	10	2	1	3	50/ 53	18	(36.0)
D	10	10	1	4	75/ 86	26	(34.7)

Table 2-5. Results of non-surgical transfer of embryos derived from oocytes matured and fertilized in vitro

Treat- ment	Cow no.	Pretreated A.I.	No.of blastocysts transferred	Fresh or frozen	Parturition(BW) or return data
A	261	+	2	Fresh	Parturition(51.0)
	275	+	3	Frozen	(+)
	285	+	2	Frozen	Return on day 50
	297	-	2	Frozen	Return on day 42

B	245	+	2	Fresh	(+)

C	95	-	2	Fresh	Parturition(39.5)
	247	+	3	Frozen	Parturition(31.5)(35.3)**
D	274	-	3	Frozen	Parturition(40.5)

(+):Pregnancy by A.I.

*:Birth weight

** :Birth weight from pregnancy by E.T. and A.I.

して不十分であったにもかかわらず、受精成績およびその後の胚発生能に対しても特に影響を及ぼさなかった。

Schroeder and Eppig(1984)は、マウス卵母細胞の成熟培地へのホルモンの添加が、その後の発生能に対する影響を検討した。その結果、ホルモン無添加の成熟培地を用いた場合にも胚盤胞さらに産子を得られており、ホルモン添加の効果が明らかでないことを示唆している。また、Fukui and Ono(1989)はウシにおいて、血清、ホルモンおよびgranulosa cellsを成熟培地へ添加した場合にgranulosa cellsとのco-cultureが胚盤胞発生への最も重要な要因であることを示しているが、ホルモンの添加は影響を及ぼさなかったと述べており、本実験における家兎卵管内での胚の発育性と一致した。しかしながら、今回の実験系では卵丘細胞を含む顆粒膜細胞を同時に培養している。このような実験系では既に共存細胞からの成長因子等の影響を受けており、ホルモンの添加効果は明らかとはならなかった。また、流動パラフィンを用いる実験系では、ステロイドホルモンの流出が生じて培地中の濃度が低下する可能性があることから (Miller et al.;1987,Xu et al.;1987b)、これらを考慮に入れた、より厳密な検討が必要と考えられる。Stubbings et al.(1988)は、ウシで E_2 を成熟培養当初から加え、FSHとLHは培養の6時間目から添加することによって高い受精率、桑実胚発生率を得ている。しかし、Stubbings et al.(1988)も本実験のように流動パラフィンを用いる実験系であり、同様にステロイドホルモンの流動パラフィンへの流出を考慮に入れる必要がある。

移植試験の結果、ホルモン無添加の培地で体外成熟後受精することによって作出された胚盤胞が受胎性を持ち、正常産子に発育することが証明された。本実験ではホルモン添加のCおよびD区で発生した胚盤胞を移植した3頭全例から産子を得られた。しかし、移植頭数も少なく、ホルモン添加培地で成熟させた卵子に由来する胚盤胞の受胎性が高いという結論をだすには至らなかった。

IV 摘要

ウシ卵母細胞の体外成熟培地へのFSH、LHやE₂の添加が体外受精後の胚発生能に及ぼす影響を検討した。

ウシ卵母細胞の成熟用基礎培地には、10%FCS添加ヘブス緩衝M-199を用い、ホルモンを加えないA区、LH(10 μ g/ml)とE₂(1 μ g/ml)を含むB区、B区にFSH(2または10 μ g/ml)を添加したCおよびD区の4区を設定し、22時間成熟培養した。種雄牛1頭からの凍結精液を既報のとおり処理後卵子に授精し、6時間後に発生培地(10%非働化去勢牛血清および0.5mMピルビン酸ナトリウム添加ヘブス緩衝M-199)に移し変えた。授精10～20時間後の抜き取り検査による受精率は88.2～90.9%で各区間に有意差は認められなかった。授精50時間後に4細胞期以上に分割した胚の割合は、A区37.4% (122/326)、B区31.4% (103/328)、C区29.7% (102/343)、D区35.6% (122/343)で、A-C区間のみで有意差が認められた。これらの胚を偽妊娠家兎卵管内へ移植して115時間後に回収し、回収胚を発生培地でさらに24時間体外培養したところ、A区で39.6%、B区で49.3%、C区で36.0%、D区で34.7%の胚がそれぞれ胚盤胞へ発生しており、各区間で有意差は認められなかった。また、胚盤胞の1部を8頭の受胎牛に移植したところ、ホルモン無添加のA区でも出産例が得られた。

以上の結果から、卵丘細胞を含む顆粒膜細胞と同時に培養する本実験系において、卵母細胞の体外成熟培地へのゴナドトロピン、E₂の添加は、体外受精後の発生能に対して特に効果を持たなかった。

第3節 培養温度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響

ウシ卵母細胞の体外培養温度による成熟能および受精能を検討した研究は、Lenz et al.(1983)および湊ら(1986)によりなされている。Lenz et al.(1983)は、37℃の培養区に比べて39℃での培養区が卵母細胞の成熟率および受精率が高いと述べている。また、湊ら(1986)は、卵母細胞を39℃で成熟培養した区が37℃で培養した区より第2減数分裂中期の出現ピークまでの時間が短縮することを認めている。同様に、Eng et al.(1986)は、ブタ卵母細胞の培養において、39℃が37℃より第1極体放出割合の高いことを確認している。しかしながら、以上の報告は受精以後の発生能について明らかにしていない。一方、Lavy et al.(1988)は、マウス2細胞期胚を用いて体外培養を実施し、培養温度が初期胚の発育速度に関与し、39℃が37℃および41℃よりも胚の発育が速いことを示し、培養条件としては39℃が良好であるとしている。

本節では、培養温度がウシ卵母細胞の成熟、精子処理、授精およびその後の胚発生に及ぼす影響を検討した。

I 材料および方法

1 卵母細胞の体外成熟

卵母細胞の成熟培地は、10%非働化牛胎児血清(GIBCO)と抗生物質(100iu/ml結晶ペニシリンGカリウム、100μg/ml硫酸ストレプトマイシン、明治製菓)添加25mMヘプス緩衝TCM-199(GIBCO)を用いた。屠殺後30分以内に採取した卵巣を、37℃に保温した滅菌生理食塩水中に入れて、2時間以内に実験室に持ち帰った。卵母細胞は卵巣表面の直径5mm以下の小卵胞から、あらかじめ1mlの修正Dulbeccoリン酸緩衝液(m-PBS)を吸引しておいた18Gの注射針の付いた5ml注射器を用いて吸引採取した。卵母細胞はm-PBSで洗浄した後、緊密な卵丘細胞層に包まれたもののみを選別し、成熟培地で2~4回洗浄した後、シ

ャーレ(35mm、Falcon)内の流動パラフィン(Merck)で覆った100 μ lの成熟培地中へ15～20個入れ、炭酸ガス培養器内(5%CO₂、95%空気(37℃および39℃)加湿型)で24時間成熟培養を行った。

2 精子処理と授精

当场繋養の3頭の種雄牛から採取した0.5mlストロー凍結精液を37℃の温湯中で融解し、小試験管内でウシ血清アルブミンを除いた修正タイロード液(B0液)に10mM caffeine(安息香酸ナトリウムcaffeine中のcaffeineを50%として計算、Sigma)を加えた液(Caf-B0液)で2回洗浄した。洗浄後精子濃度をCaf-B0液で 25×10^6 /mlに調整し、ウシ血清アルブミン(Fraction V, Sigma)を20mg/mlに修正したタイロード液(BSA-B0液)で精子浮遊液を等倍希釈した。BSA-B0液で希釈した精子浮遊液を100 μ lの小滴にして滅菌流動パラフィンで被い、37℃および39℃の炭酸ガス培養器内で5時間ブレインキューベーションした。授精の際に、成熟培養の完了した卵母細胞をBSA-B0液で洗浄し、精子懸濁ドロップ中に入れた。授精6時間後、卵子を発生培地に移した。発生培地は25mMヘース緩衝TCM-199に、1%新生子牛血清(三菱化成(株))と抗生物質(結晶ペニシリンGカリウム100iu/ml、硫酸ストレプトマイシン100 μ g/ml、明治製菓)とを加え、滅菌流動パラフィン下のドロップとした。授精10-12時間後に受精率の検査のため、卵子を固定染色して、位相差顕微鏡で雌雄両前核と精子尾部の存在を観察した。

3 体外受精胚の体外培養

授精の6時間後、胚を発生培地に移してさらに培養した。発生培地には25mMヘース緩衝TCM-199(GIBCO)に、新生子牛血清(三菱化成(株))を10%と抗生物質(100iu/ml結晶ペニシリンGカリウム、100 μ g/ml硫酸ストレプトマイシン、明治製菓)とを加えた。授精の48時間後に卵丘細胞層を除去して、発生を検査し、さらに48時間毎に発生培地を置換して、ドロップ内で体外培養を継続した。授精48時間後に5～8細胞期胚および授精7～

8日後に胚盤胞に発生した胚を発生胚とした。

実験1：卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度を37℃および39℃とし、授精の10～12時間後の受精率を3頭の種雄牛の凍結精液を用いて検討した。

実験2：1頭の種雄牛の凍結精液を用いて卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度をそれぞれ1区：37・37-37℃、2区：37・39-39℃、3区：39・37-37℃、4区：39・37-39℃、5区：39・39-37℃および6区：39・39-39℃とする6試験区を設定して、卵母細胞の成熟、精子前処理および授精時の温度が受精率に及ぼす影響を検討した。

実験3：卵母細胞の成熟、精子前培養および授精までを前期とし、それ以後、授精8日目までを後期としてそれぞれを37℃および39℃で培養する4試験区を設定し、授精の48時間後および7～8日後の胚の発生を検討した。

以上の実験の受精率と胚発生率を χ^2 検定で統計分析を行った。

II 結果

実験1：3頭の種雄牛の精液を用いて成熟、体外受精ならびにその後の培養を37℃および39℃とした培養条件でのウシ卵母細胞の受精率はTable 2-6のとおりである。種雄牛A、Bとも、多精子侵入を含む受精率は39℃区が高かった（種雄牛A： $P<0.05$ 、種雄牛B： $P<0.01$ ）。しかし、39℃区が多精子侵入率が高いため、種雄牛Aでは、単精子侵入のみの受精率は37℃区、39℃区で差が認められなかった。種雄牛Bでは、単精子侵入のみの受精率は39℃区が高い値を示した（ $P<0.01$ ）。種雄牛Cでは、両区に差はなかった。このように個体によって受精率の高いものでは37℃から39℃への効果は顕著でないが、37℃で低い受精率の個体で39℃によって著しく受精率の改善されるものがみられた。

実験2：卵母細胞の成熟、精子前培養および授精のいずれが培養温度を介して受精率に関与しているかを調べた結果をTable 2-7に示した。成熟時の培養温度が受精率に及ぼす影響を明らかにするために1区と3区、2区と6区をそれぞれ比較したところ、共に差が

Table 2-6. Effect of incubation temperature for maturation and fertilization of bovine oocytes on the subsequent fertilization rates in vitro

Incubation		No. of oocytes			
temperature		Examined	Unfertilized	Fertilized(%)	Monospermy(%)
Bull	37°C	110	29	81 (73.6)*	71 (64.5)
A	39°C	104	16	88 (84.6)*	64 (61.5)
Bull	37°C	136	74	62 (45.6)**	59 (43.4)**
B	39°C	165	16	149 (90.3)**	132 (80.0)**
Bull	37°C	80	36	44 (55.0)	43 (53.8)
C	39°C	77	25	50 (64.9)	45 (58.4)

* : P<0.05, ** :P<0.01 in same column in same bull.

Table 2-7. Effect of incubation temperature for oocyte maturation, sperm capacitation and fertilization on the fertilization rates of bovine oocytes in vitro

Incubation temperature(°C)			No. (%) of oocytes			
before insemination	sperm preincubation	at & after insemination	Examined	Unfertilized	Fertilized	Monospermy
37	37	37	121	49	72 (59.5) ^c	70 (57.9) ^b
37	39	39	60	8	52 (86.7) ^a	40 (66.7) ^{a b}
39	37	37	127	44	83 (65.4) ^{b c}	77 (60.6) ^b
39	37	39	68	16	52 (76.5) ^{a b}	45 (66.2) ^{a b}
39	39	37	66	21	45 (68.9) ^{b c}	42 (63.6) ^b
39	39	39	124	19	105 (84.7) ^a	98 (79.0) ^a

a,b,c: The different superscripts are significantly different in same column($P < 0.05$).

なかった。精子前培養時の培養温度が受精率に及ぼす影響を検討するために3区と5区、4区と6区をそれぞれ比べたところ受精率には差がなかった。そこで、成熟時および精子前培養時の培養温度は受精率に大きく関与していないことが示唆された。授精以後の培養温度が受精率に及ぼす影響を検討するために、3区と4区、5区と6区をそれぞれ比較した結果、3区と4区で受精率に差はなかったが、5区と6区では単精子受精率および多精子を含む受精率で有意な差($P<0.05$)が認められ、39℃で高い傾向があった。

実験3：卵母細胞の成熟、精子前培養および授精までを前期とし、それ以後、授精8日目までを後期としてそれぞれを37℃および39℃で培養する4試験区を設定し、授精の48時間後および7～8日後の胚の発生はTable 2-8のとおりである。授精48時間後に5～8細胞期に発生した胚を正常発生胚として、その割合を検討したところ後期を39℃で培養した区において高かった ($P<0.05$)。

また、授精7～8日目の胚盤胞の出現時期は、後半39℃区が早く、後半37℃培養区では授精の7日目に胚盤胞は、出現しなかった。

Ⅲ 考察

種雄牛个体によって傾向は異なるものの、体外成熟、体外受精環境としては、39℃が有効であることが示唆されたが、これは、Lenz et al.(1983)の結果と同様であった。花田ら(1985a)は種雄牛による精子受精能獲得誘起の差異を検討し、精子前培養と授精温度を39℃にすることによって処理後の受精率が増加する個体のあることを指摘している。本実験でも個体によって傾向が異なっていた。

湊ら(1986)はウシについて、Eng et al(1986)はブタについて、卵母細胞の体外成熟に培養温度が関与していることを示している。そこで卵母細胞の成熟、精子前培養および授精のいずれが培養温度を介して受精率に関与しているかを調べたところ、授精以後の温度が受精率に関与していることが示唆された。しかし、授精以後の培養温度を高くす

Table 2-8. Effect of incubation temperature on the developmental ability of bovine oocytes matured, fertilized and cultured in vitro

Incubation temperature(°C)		No. of eggs	No. (%) of embryos			
Before fertilization	After fertilization		48h after insemination			7(8) days
		examined	1-3cell	4-cell	5-8cell	Blastocyst
37	37	117	84	16	17(14.5) ^c	0(3)
37	39	110	47	13	50(45.5) ^a	8(0)
39	37	110	58	24	28(25.5) ^b	0(6)
39	39	114	49	9	56(49.1) ^a	14(1)

a,b:The different superscripts are significantly different (P<0.05).

ることにより受精率が高くなる原因については、今回の結果からは、明らかにされなかった。また、受精時の精子と卵子の融合を含む相互作用に高温環境が有効に働くことが示唆された。

Lenz et al.(1983)は、ウシ卵母細胞を39℃で培養した場合の成熟率および受精率が高い原因として、生体内温度が、39℃であるためとしている。しかし、本研究で高温の効果が成熟や受精能獲得の過程よりも受精時や受精後の培養時の効果が強くみられた事実は、新しい知見と考えられる。また、受精時までを37℃または39℃とし、受精後39℃で培養した場合の5細胞期以上胚率に差がないことから、受精時までの温度が低い場合には、受精率を検査した受精10-12時間以後に遅れて受精する可能性も示唆された。

これまでに、ウシ初期胚の培養温度を検討した報告はみられないが、マウスを用いた Lavy et al. (1988) の報告では、培養温度が初期胚の発育速度に大きく関与しており、39℃が37℃および41℃に比較して発育が速いとしている。今回の結果も同様に39℃の培養温度が37℃より良好であった。また、Lavy et al.(1988)は、マウス胚が39℃で発育の速い原因について、体細胞と同様に胚細胞においてもDNA合成能が上昇するためであると推察している。このことは、花田ら(1986)、Lu et al.(1987)らの受精後の初期胚を家兎卵管、ヒツジ卵管を用いた培養時の39℃の体内温度が、胚生存にとって良好な温度環境であると考えたこととも一致する。さらに、受精7～8日後の胚盤胞へ発生した胚数は全期間を39℃とした場合に多いことから、受精時までを39℃で培養する条件が卵母細胞の成熟に影響し、その後の胚盤胞発生率を高くする傾向がみられた。

以上の結果から、ウシ卵母細胞の成熟、受精およびその後の胚培養温度は、37℃より39℃が良好であり、成熟、精子前培養を含めた培養の全期間を39℃とすべきことが確認された。

IV 摘要

ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養、授精およびその後の発生を37℃および39℃で実施し、ウシ卵母細胞の受精率に及ぼす培養温度の影響を検討した。

実験1では、卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度を37℃および39℃とし、授精の10～12時間後の精子侵入率を3頭の種雄牛の凍結精液を用いて調べた。その結果、種雄牛個体によって傾向は異なるものの、体外成熟、体外受精環境としては、39℃が適切であることが示唆された。

実験2では、1頭の種雄牛の凍結精液を用いて卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度の影響を詳細に検討するため、卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までをそれぞれ37・37-37℃、37・39-39℃、39・37-37℃、39・39-37℃、39・37-39℃および39・39-39℃とする6試験区を設定した。その結果、授精以後の培養温度は、受精率に関与しており、39℃が有効であることが明らかとなった。

実験3では、ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養および授精までを前期とし、それ以後授精8日目までを後期とし、それぞれを37℃および39℃で培養する4試験区を設定し、授精48時間後ならびに7～8日後の胚発生を検討した。授精48時間後の5～8細胞期胚の割合は、後期を39℃で実施した区が37℃で実施した区より高かった。また、胚盤胞の出現時期は、後期39℃区が早い傾向があり、後期37℃区では授精7日目では胚盤胞は出現しなかった。授精時の温度が39℃の場合に受精率が高かったが、37-39℃区および39-39℃区を比べたところ授精48時間後の5～8細胞期胚の割合に差がなかった。しかし、授精7～8日後の胚盤胞へ発生した胚数は全期間を39℃とした場合に多いことから、授精時までを39℃で培養する条件が卵母細胞の成熟に影響し、その後の胚盤胞発生率を高くする傾向がみられた。

以上の結果から、ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養、授精およびその後の発生培養の温度は、37℃より39℃が良好であり、全期間を39℃とすべきことが確認された。

第4節 酸素濃度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響

体外受精、体外発生系において、卵子の成熟培養時の条件が卵母細胞の核と細胞質の成熟の程度に関係し、その程度が受精後の発生率に反映することが知られている。その内、酸素濃度が成熟に影響することはHaidri et al.(1971)がマウス卵母細胞を用いて、気相中の酸素濃度5-10%が良好であり、それ以上の酸素濃度では濃度依存的に成熟率が低下することを示している。その理由についてBetterbed and Wright(1985)は、酸素が表層膜に対して酸化障害をおこすためとしている。

本節では、成熟培養時の酸素濃度がウシ卵母細胞の体外成熟、体外受精率とその後の発生に及ぼす影響を調べるために実施した。

I 材料および方法

1 卵母細胞の体外成熟

本章、第3節と同様に卵母細胞を採取し、35mmシャーレ(Falcon)内の滅菌流動パラフィン(Merck)で被った100 μ lの成熟培地内に10個ずつの卵を入れた。その後、2個のガスコックの付いた160 \times 100 \times 60mm密封容器中に静置した。密封容器には、卵子の入ったシャーレの他に加湿用の滅菌蒸留水の入ったシャーレ (Fig. 2-3)を入れた。混合ガス器 (GM-3A、(株)小島製作所、Fig. 2-3)で作成した混合ガスを2000ml/minの流量で2分間密封容器に流し込み、密封後39 $^{\circ}$ Cの炭酸ガス培養器内に静置して24時間成熟培養した。なお、ドロップ作成には、予め混合ガスを吹き込んでガス平衡した滅菌流動パラフィンを使用した。混合ガスは、炭酸ガス濃度を5%とし、酸素濃度を2.5、5、10、20および40%の5区とし、残りを窒素とした。なお、空気中の酸素濃度は約21%であるので20%区は5%炭酸ガス、95%空気の気相を用いた。

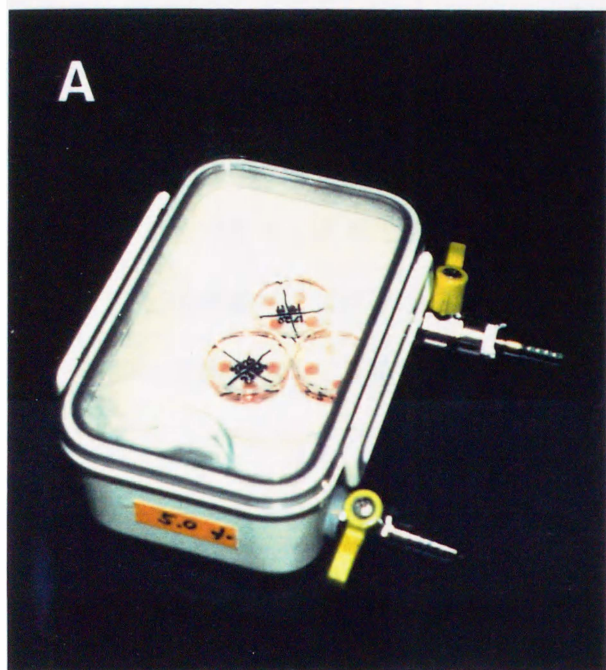


Fig. 2-3. Equipments for gas mixing and culture.

A) Culture dishes in the small desiccator.

B) Gas mixing system.

2 精子処理と授精

当场繋養の1頭の種雄牛からの0.5ml凍結精液を用いて、本章、第3節と同様に授精した。

3 受精率の検査

卵子を授精6時間後、5%炭酸ガス、95%空気気相下の発生培地に移した。発生培地は25mMヘブス緩衝TCM-199に、1%新生子牛血清（三菱化成（株））と抗生物質（結晶ペニシリンGカリウム100iu/ml、硫酸ストレプトマイシン100 μ g/ml、明治製菓）とを加え、滅菌流動パラフィン下のドロップとした。授精10-12時間後に受精率の検査のため、卵子を固定染色して、位相差顕微鏡で雌雄両前核と精子尾部の存在を観察した。

4 ガス分圧の測定

平衡24時間目の静置培養液の酸素、炭酸ガス分圧およびpH値測定には血液中の分圧およびpHを測定するためのCorning社製の自動測定装置(175)を用いた。材料は、測定直前まで密封容器内に静置し、注射器で素早く測定装置に注入して測定した。

5 実験方法

実験1：5種類の混合ガスを気相ガスとして用いて24時間培養後の卵母細胞成熟率に及ぼす酸素濃度の影響を検討した。

実験2：実験1と同一条件で、成熟した卵子の、授精10-12時間後の受精率を検討した。

実験3：成熟培養および授精時の気相は、20%酸素の5%炭酸ガス、95%空気とした。授精6時間後に胚を滅菌流動パラフィン下の100 μ lのドロップとした発生培地に移した。その後、実験1と同様に密封容器に静置し、混合ガス器で作成した5%酸素、5%炭酸ガス、90%を窒素の混合ガスを注入した区と炭酸ガス培養器内で培養する酸素濃度20%区の2種類の気相を用いた。

授精48時間後に卵丘細胞層を除去して、発生を検査し、さらに48時間毎に発生培地を置換して、ドロップ内で体外培養を継続した。授精48時間後に5～8細胞期胚および授精7～8日後に胚盤胞に発生した胚を発生胚とした。

各実験の卵母細胞の成熟率、受精率および胚発生率について χ^2 検定を行った。

II 結果

実験1：各酸素濃度における卵母細胞の成熟結果をTable 2-9に示した。酸素濃度2.5-20%区は酸素濃度40%区に比較して有意に高い成熟値を示した($P<0.05$)。しかし、酸素濃度5%区および酸素濃度10%区の83%をピークとして酸素濃度上昇と共に成熟率が減少する傾向が認められた。

実験2：成熟時の酸素濃度が卵母細胞の受精率に及ぼす影響を検討した結果をTable 2-10に示した。受精率は高濃度区で低下する傾向にあり実験1で成熟率の低かった酸素濃度40%区が酸素濃度10%区に対して有意に低かった($P<0.05$)。また、多精子侵入卵が酸素濃度40%区で多い傾向があった。

実験3：Table 2-11に胚の発生結果を示した。4細胞期以上に発生した胚の割合は、酸素濃度5%区で65.3%、酸素濃度20%区で54.3%と両者間に有意な差は認められなかった。胚盤胞率においては、酸素濃度5%区の23.9%が20%区の14.4%に比較して有意に高かった($P<0.05$)。

III 考察

卵母細胞の成熟は、卵胞内の抑制因子からの解放により減数分裂が再開されることが知られている(佐藤ら;1977)が、酸素濃度を空気中の約21%よりも低くすることで成熟率を大きく改善できなかった。すなわち、酸素濃度は卵母細胞の減数分裂再開を支配する

Table 2-9. The effect of oxygen tension on the development of bovine oocytes matured in vitro

Oxygen tension in gas phase (%)	No. of trials	No. of oocytes			
		Examined	Deg.*	GV-T-I*	M-II*(%)
2.5	4	128	0	23	105(82.0) ^a
5	4	117	0	19	98(83.8) ^a
10	4	128	2	19	107(83.6) ^a
20	4	145	1	30	114(78.6) ^a
40	4	163	3	51	109(66.9) ^b

a,b:The different superscripts are significantly different($P<0.05$).

*:Deg.;Degenerated, GV-T-I;Germinal vesicle to telophase-I, M-II;Metaphase-II

Table 2-10. The effect of oxygen tension in the gas phase during maturation process on the fertilization of bovine oocytes

Oxygen tension in gas phase (%)	No. of trials	No. of oocytes		
		Examined	Fertilized(%)	Polyspermy(%)
2.5	3	68	61(89.7) ^{a b}	10(16.4)
5	3	69	59(85.5) ^{a b}	9(15.3)
10	3	71	67(94.4) ^a	8(11.9)
20	3	69	60(87.0) ^{a b}	8(13.3)
40	3	70	57(81.4) ^b	13(22.8)

a,b:The different superscripts are significantly different(P<0.05).

Table 2-11. The effect of oxygen tension on the developmental capacity of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

Oxygen tension (%)	No. of eggs examined	No.(%) of eggs after insemination		
		48 hrs		7 ~ 8 days
		1-3cell	4-cell \leq	Blastocyst
5	213	74	139 (65.3)	51 (23.9) ^a
20	188	86	102 (54.3)	27 (14.4) ^b

a,b:The different superscripts are significantly different in the same column(P<0.05).

要因には関与せず、濃度上昇に伴う細胞障害(Freshney;1987、Ham and McKeehan;1981)により生存性を抑制して成熟率を低下させたものと推察された。また、成熟時の酸素濃度40%区は、受精率においても他区に対して有意に低かった($P<0.05$)。これらは、高酸素による細胞障害を受けていることを示唆する結果であった。しかし、酸素濃度2.5-20%区については成熟率と受精率とに特に差は認められなかった。

Table 2-12に各混合ガス平衡の24時間後、すなわち、培養開始時の培養液中の酸素、炭酸ガス分圧およびpHを示した。pHは全て、7.35~7.38の間で、設定値に一致した。炭酸ガス濃度は30.3~32.1mmHgであり、Henryの法則による5%濃度の理論値38mmHgに比較してやや低かった。このような条件では酸素分圧は低濃度で理論値より高く、設定値が高濃度の場合に低い傾向が認められ、pH等に影響を与えないことが明らかにされた。培養条件として本実験系のような簡易な小容器を用いたが、密封した培養方法でも卵母細胞が成熟することが示された。実際の培養条件について比較してみると、今回の密封容器を用いた微小滴ドロップ法とは異なってHaidri et al.(1971)やTervit et al.(1972)は試験管を用いており、両者の結果を一元的に比較できないものと思われる。また、密封した実験においても小試験管とデシケーターでは、用いる培養液に対する混合ガスの比率が異なり環境は大きく違っている。今回用いた密封容器内での実験では、例えば、5%酸素、5%炭酸ガス、90%窒素に設定した混合ガスを注入した場合、最終的に培養液内の酸素分圧として計測した結果では、76.8mmHgと約10%酸素濃度相当であり、その他の区についても必ずしも設定したガス分圧になり得ていない。今回の液相中の酸素分圧は、2.5~10%酸素濃度区で9.1~13.1%相当であり、液相の酸素濃度をもっと低くすることによってHaidri et al.(1971)の示すような顕著な影響が得られる可能性がある。そのような意味から今後、液相中の酸素分圧を予定通りに調整するために、連続的にガスを注入できる実験系を用いて検討する必要がある。これまで培養細胞が空气中よりも高い酸素濃度の培養条件で細胞の生存性に対して抑制的に働くとされている。今回の結果は、これまでの結果を追試する成績となり、Haidri et al.(1971)のマウス卵母細胞が5~

Table 2-12. Oxygen and CO₂ tension and pH in the medium under mixed gas after 24 hours culture

Oxygen tension in gas phase(%)	Medium condition		
	oxygen pressure (mmHg) (%)	CO ₂ pressure (mmHg)	pH
2.5	68.8 (9.1)	30.9	7.4
5	76.8 (10.1)	30.6	7.4
10	99.3 (13.1)	31.9	7.4
20	167.3 (22.0)	30.3	7.4
40	266.9 (35.1)	32.1	7.4

10%酸素濃度区をピークとし酸素濃度上昇にともなって成熟率が低下するという結果と推移は同様であった。

実際の卵管内酸素分圧は家兎で30～45mmHgまたは56～64mmHgとされ、これは、4～8%酸素濃度に相当している(入谷;1981)。卵母細胞、初期胚に限定せず、培養細胞にとって高酸素濃度が有害であることはFreshney(1987)やHam and McKeehan(1981)によって報告されている。その原因については、明らかにされてはいないが、今回の結果でも体外成熟率が酸素濃度40%区(実測値35%)で有意に低く、さらに体外受精結果についても受精率では有意な差は認められないものの細胞膜の変化によると考察される多精子侵入卵率の上昇傾向が認められた。

これまでに、酸素濃度が初期胚の体外培養環境に関連していることは、ヒト(Dorfmann et al.;1987)、マウス(小野寺と角田;1988, Quinn and Harlow;1978, 馬岡ら;1989)、ヒツジ(Tervit et al.;1972)、ブタ(Davis and Day;1978, Wright;1977)あるいは、ウシ(Tervit et al.;1972, Wright et al.;1976a,b, Thompson et al.;1990)において検討され、空気中よりも酸素濃度の低い5%気相が適しているとされている。その理由について Betterbed and Wright(1985)は、酸素が表層膜に対して酸化障害をおこすためとしている。今回の結果でも高酸素濃度の20%区では酸素による障害(Freshney;1987, Ham and McKeehan;1981)によると思われる発生率の低下が認められた。さらに、馬岡ら(1989)は、マウスの2-cellブロックの解除とその後の発生成績に酸素濃度が大きく関与しているだけでなく酸素濃度がsuperoxide dismutaseとの間に相乗効果のあることを認めたと述べている。今後、培養環境においては、酸素毒性に対する配慮が必要なことを示唆していると考えられた。

IV 摘要

培養時の酸素濃度がウシ卵母細胞の体外成熟に及ぼす影響を検討した。使用した混合

ガスは、炭酸ガス濃度を5%とし、酸素濃度を2.5、5、10、20および40%とし、残りを窒素ガスとした。その結果、ウシ卵母細胞の成熟培養時の酸素濃度が成熟率に及ぼす影響を検討したところ、気相中の実測酸素濃度10%前後を頂点として、酸素濃度の上昇と共に成熟率が低下した。特に、実測酸素濃度35%区が66.9%(109/163)と他区の78.6-83.3%に対して有意に低かった($P<0.05$)。成熟培養時の酸素濃度が卵母細胞の受精率に対する影響を検討したところ、単精子受精率が実測酸素濃度35%区で低かった。胚盤胞に発生した胚の割合は、実測酸素濃度13%区が酸素濃度20%区に比較して有意に高かった($P<0.05$)。

以上の結果から、ウシ卵母細胞の成熟においては実測酸素濃度35%区で、成熟率とその後の受精率が低かった。受精後の胚発生には実測酸素濃度13%で高いことが明らかとなった。

第5節 小括

ウシ卵母細胞の体外成熟条件を改善して成熟およびその後の胚発生の良好な培養条件を解明するために、第2章では、ウシ卵母細胞の体外成熟に影響する培養環境条件を検討した。

第2節では、ウシ卵母細胞の体外成熟培地へのFSH、LHやE₂の添加が体外受精後の胚発生成能に及ぼす影響を検討した。ウシ卵母細胞の成熟用基礎培地には、10%FCS添加へブス緩衝M-199を用い、ホルモンを加えないA区、LH(10 μ g/ml)とE₂(1 μ g/ml)を含むB区、B区にFSH(2または10 μ g/ml)を添加したCおよびD区の4区を設定し、22時間成熟培養した。授精10～20時間後の抜き取り検査による受精率は88.2～90.9%で各区間に有意差は認められなかった。授精50時間後に4細胞期以上に分割した胚の割合は、A区37.4% (122/326)、B区31.4% (103/328)、C区29.7% (102/343)、D区35.6% (122/343)で、A-C区間のみで有意差が認められた。これらの胚を偽妊娠家兎卵管内へ移植して15時間後に回収し、回収胚を発生培地でさらに24時間体外培養したところ、A区で39.6%、B区で49.3%、C区で36.0%、D区で34.7%の胚がそれぞれ胚盤胞へ発生しており、各区間で有意差は認められなかった。また、胚盤胞の一部を8頭の受胎牛に移植したところ、ホルモン無添加のA区でも出産例が得られた。

以上の結果から、卵丘細胞を含む顆粒膜細胞と同時に培養する本実験系において、卵母細胞の体外成熟培地へのゴナドトロピン、E₂の添加は、体外受精後の発生能に対して特に効果を持たなかった。

第3節では、ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養、授精およびその後の発生を37℃および39℃で実施し、ウシ卵母細胞の受精率およびその後の胚発生に及ぼす培養温度の影響を検討した。卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度を37℃および39℃とし、授精の10～12時間後の精子侵入率を3頭の種雄牛の凍結精液を用いて調べたところ、種雄牛個体によって傾向は異なるものの、体外成熟、体外受精環境として

は、39℃が適切であることが示唆された。1頭の種雄牛の凍結精液を用いて卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までの温度の影響を詳細に検討するため、卵母細胞の成熟、精子前培養および授精以後標本作成までをそれぞれ37・37-37℃、37・39-39℃、39・37-37℃、39・39-37℃、39・37-39℃および39・39-39℃とする6試験区を設定したところ、授精以後の培養温度は、受精率に関与しており、39℃が有効であることが明らかとなった。ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養および授精までを前期とし、それ以後授精8日目までを後期とし、それぞれを37℃および39℃で培養する4試験区を設定し、授精48時間後ならびに7～8日後の胚発生を検討したところ、授精48時間後の5～8細胞期胚の割合は、後期を39℃で実施した区が37℃で実施した区より高かった。また、胚盤胞の出現時期は、後期39℃区が早い傾向があり、後期37℃区では授精7日目では胚盤胞は出現しなかった。授精の温度が39℃の場合に受精率が高かったが、37-39℃区および39-39℃区を比べたところ授精48時間後の5～8細胞期胚の割合に差がなかった。しかし、授精7～8日後の胚盤胞へ発生した胚数は全期間を39℃とした場合に多いことから、授精時までを39℃で培養する条件が卵母細胞の成熟に影響し、その後の胚盤胞発生率を高くする傾向がみられた。

以上の結果から、ウシ卵母細胞の成熟、精子前培養、授精およびその後の発生培養の温度は、37℃より39℃が良好であり、全期間を39℃とすべきことが確認された。

第4節では、培養時の酸素濃度がウシ卵母細胞の体外成熟に及ぼす影響を検討した。使用した混合ガスは、炭酸ガス濃度を5%とし、酸素濃度を2.5、5、10、20および40%とし、残りを窒素ガスとした。その結果、ウシ卵母細胞の成熟培養時の酸素濃度が成熟率に及ぼす影響を検討したところ、気相中の実測酸素濃度10%前後を頂点として、酸素濃度の上昇と共に成熟率が低下した。特に、実測酸素濃度35%区が66.9%(109/163)と他区の78.6～83.3%に対して有意に低かった($P<0.05$)。成熟培養時の酸素濃度が卵母細胞の受精率に対する影響を検討したところ、単精子受精率が実測酸素濃度35%区で低かった。胚盤胞に発生した胚の割合は、実測酸素濃度13%区が酸素濃度20%区に比較して有

意に高かった($P<0.05$)。

以上の結果から、卵丘細胞を含む顆粒膜細胞と同時に培養する本実験系において、ウシ卵母細胞の体外成熟培地へのゴナドトロピン、 E_2 の添加は、体外受精後の発生能に対して特に効果を持たないことが判明した。ウシ卵母細胞の培養温度は、 37°C より 39°C が良好であり、全期間を 39°C とすべきことが確認された。また、ウシ卵母細胞の成熟においては実測酸素濃度35%区で、成熟率とその後の受精率が低かった。受精後の、胚発生には実測酸素濃度13%で高いことが明らかとなった。

第3章 ウシ体外受精における種雄牛個体による受精率の差異と精子前培養時のHeparinおよびCaffeineの体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響

第1節 緒言

Iritani and Niwa(1977)はウシ精子の受精能獲得を体外で誘起し、体外で成熟した卵母細胞と体外受精後に初期受精像を初めて確認した。その後、体内で成熟した卵母細胞を用いてBrackett et al.(1982)によりウシで最初の体外受精由来産子が得られて以来、同様の方法でSirard and Lambert(1986)が、また、体外で成熟した卵母細胞を用いて花田ら(1986)、Critser et al.(1986)、Lu et al.(1987)他、多くのグループによって体外受精産子が得られている。このことは、これまで困難とされていたウシ精子の体外での受精能獲得誘起が高イオン強度処理、洗浄、イオノホアA23187処理またはHeparin処理と各研究者によって異なるものの、人為的な処理によって体外でも可能となってきたことを示している。また、屠畜場由来の卵巣から得られる卵母細胞を体外で成熟させた後に体外受精に用いる方法(花田ら,1986、Critser et al.,1986,Lu et al.,1987)は、Betteridge(1977)によっても述べられているようにBrackett et al.(1981)、Sirard and Lambert(1985)が用いた体内で成熟した卵子を用いる方法に比べて、手技、経済性などの面から体外受精実用化において有効な手法と考えられる。同時に体外受精のための精子受精能獲得誘起条件の解明に際して有用な材料となると考えられる。そこで、体外成熟したウシ卵母細胞を用いて、高い受精率、発生率と胚盤胞発生率が得られるウシ精子の前培養条件を検討した。

本章では、ウシ卵母細胞を体外で成熟させた後、第2節では20頭の種雄牛の精子を用いて個体による受精率と胚発生率を検討した。さらに、第3節ではウシ精子前培養時の精子

処理培養液中のHeparinとCaffeineの添加が受精率および精子侵入の経過に及ぼす影響を明らかにした。

第2節 体外受精における受精率と胚発生率の種雄牛個体による差異

これまで、種雄牛によって体外受精後の受精率に個体差がみられるという報告がなされている (Iritani et al.;1986, Niwa and Ohgoda;1988, Hillery et al.;1990)。しかし、受精率の個体差がその後の発生能に影響を及ぼすかについてはLeibfried et al. (1987)によって報告され、受精率とその後の発生能とは関連がないことを示している。また、Shi et al.(1990)は、分割率と胚盤胞への発生率を検討し、ともに個体による差はあるが、両者間に必ずしも一定の関係はなかったとしている。

そこで、本節では、Caffeineを加えた培養液で前処理を行った場合の種雄牛ごとの体外受精率およびその後の胚発生能の差を比較し、さらに、体外受精技術改良の基礎となる有効な種雄牛選定においての選定基準の設定を目的として、当场繋養の20頭の種雄牛について受精率を、うち10頭についてその後の発生能を検討した。

I 材料および方法

1 卵母細胞の体外成熟

第2章、第3節の方法と同様に卵母細胞の体外成熟を行った。培養温度は39℃とした。

2 精子処理と授精

当场繋養の20頭の種雄牛から採取した0.5mlのプラスチックストローに保存した凍結精液を37℃の温湯中に15秒間浸漬して融解した。融解した精液を小試験管内に入れ、10mM Caffeine (安息香酸ナトリウムCaffeine中のCaffeineを50%として計算、Sigma)を加えたB0液 (Brackett and Oliphant;1975)で2回洗浄した。精子濃度を $25 \times 10^6 / \text{ml}$ に調整し、20mg/ml牛血清アルブミン (Fraction V、Sigma)を含むB0液で等倍希釈後、精子浮遊液を100 μl の小滴にして滅菌流動パラフィンで被い、39℃の炭酸ガス培養器内で5時

間ブレインキューベーションした。ブレインキューベーション後、授精の際に、成熟培養の完了した卵母細胞をB0液で洗浄して、精子懸濁ドロップ中に入れた。

3 体外受精胚の発生

受精の6時間後に卵を発生培地（10%新生子牛血清（三菱化成）添加ヘブス緩衝TCM-199(Sigma)）で数回洗浄し、付着する精子を除いた後、100 μ lのドロップとした新しい発生培地に移しかえた。授精の12時間後に卵の1部を毛細管ピペットを用いて裸化し、ホルマウント標本とした後、酢酸：エタノール（1:3）の固定液に1～2日間浸漬して固定した。さらに、常法により0.1%アセトオルセインで染色後、400～1000倍の微分干涉顕微鏡で卵細胞内の精子尾部の存在によって、受精の有無を検査した（実験1）。残りの卵は、さらに授精後48時間培養して、その後の胚発生の状態を観察した（実験2）。

II 結果

実験1：20頭の種雄牛の体外受精による受精成績をTable 3-1に示した。各種雄牛毎に28～55個の卵を検査した。成熟率は供試卵に対する第2成熟分裂中期卵または受精卵の割合であり86.5～100%であった。なお、実験区毎の成熟培養24時間後の成熟率は84.2～89.5%であった。受精率は、13.5～100%と種雄牛により大きく変動した。多精子侵入卵も各区で0～16個みられ、受精卵に対する割合は0～45.7%であった。種雄牛1～18の受精率は種雄牛19と20の受精率に対して有意に高かった($P<0.05$)。

実験2：実験1の種雄牛のうち無作為に選んだ10頭について授精48時間目の胚発生成績をTable 3-2に示した。それぞれ39～55個の卵子を用いた。4細胞期以上胚(Fig. 3-1)率は、供試卵数に対する4細胞期以上胚に発生した卵の割合を示している。個体により7.7～55.6%と変動した。種雄牛19と20の4細胞期以上胚発生率は、他の種雄牛の成績に対して5%水準で有意に低い値を示した。受精率の低い種雄牛19と20は、発生率も他の種雄

Table 3-1. In vitro fertilization of bovine oocytes with frozen-thawed sperm capacitated in B0 medium

Bull no.	No. of oocytes examined	No.(%) of oocytes		
		Matured	Fertilized	Polyspermy
1	28	28 (100)	28 (100) ^a	6 (21.4)
2	48	47 (97.9)	46 (95.8) ^a	8 (17.4)
3	44	43 (97.7)	42 (95.5) ^a	12 (28.6)
4	43	43 (100)	41 (95.3) ^a	7 (17.1)
5	37	35 (94.6)	35 (94.6) ^a	16 (45.7)
6	36	36 (100)	34 (94.4) ^a	10 (29.4)
7	41	40 (97.6)	38 (92.7) ^a	9 (23.7)
8	40	40 (100)	37 (92.5) ^a	9 (24.3)
9	41	39 (95.1)	38 (92.3) ^a	7 (18.4)
10	36	34 (94.4)	33 (91.7) ^a	9 (27.3)
11	47	46 (97.9)	43 (91.5) ^a	9 (20.9)
12	55	52 (94.5)	50 (90.9) ^a	7 (14.0)
13	40	38 (95.0)	35 (87.5) ^a	6 (17.1)
14	50	47 (94.0)	42 (84.0) ^a	7 (16.7)
15	31	28 (90.3)	26 (83.9) ^a	3 (11.5)
16	43	39 (90.7)	34 (79.1) ^a	7 (20.6)
17	44	39 (88.6)	34 (77.3) ^a	3 (8.8)
18	37	32 (86.5)	27 (73.0) ^a	2 (7.4)
19	39	35 (89.7)	6 (15.4) ^b	0
20	37	33 (89.2)	5 (13.5) ^b	0

a,b:The different superscripts are significantly different ($P<0.05$).

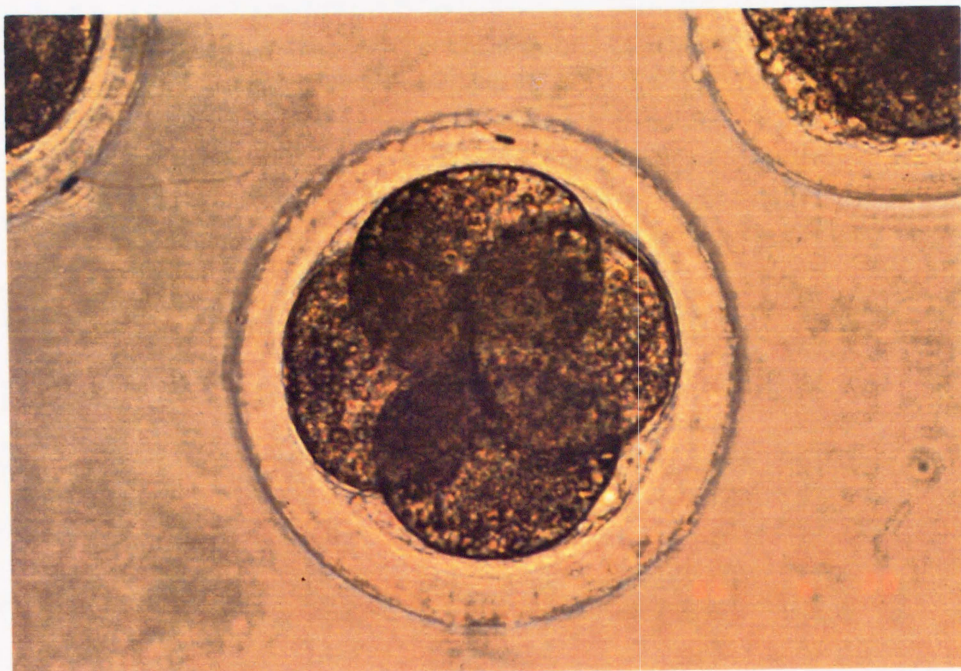


Fig. 3-1. Four-cell embryo obtained 48h after insemination.

Table 3-2. Bovine oocytes fertilized and cultured in vitro with frozen-thawed sperm

Bull	No. of oocytes examined	% of oocytes fertilized	No. (%) of embryos			Developmental ability of fertilized egg
			2-cell	3-cell	4≤cell	
1	45	100 ^a	3	6	22 (48.9) ^a	48.9
2	55	95.8 ^a	7	5	26 (47.3) ^a	49.3
5	45	94.6 ^a	7	3	20 (44.4) ^a	47.0
6	39	94.4 ^a	5	5	16 (41.0) ^a	43.5
9	54	92.3 ^a	3	6	30 (55.6) ^a	51.3
11	51	91.5 ^a	1	1	25 (49.0) ^a	53.6
12	53	90.9 ^a	5	5	19 (35.8) ^a	39.4
14	55	84.0 ^a	4	7	22 (40.0) ^a	47.6
19	39	15.4 ^b	0	2	4 (10.3) ^b	66.6
20	39	13.5 ^b	1	1	3 (7.7) ^b	57.0

a,b:The different superscripts are significantly different (P<0.05).

牛より低かった($P<0.05$)。

Ⅲ 考察

ウシ精子の受精能の予知について、精子活力検査、精子酸素消費量（住吉ら;1979）、精子膜電位（内海ら;1980）やハムスターテスト（福島ら;1986）など種々の手法による検討がなされてきたが、完全な判定法はみあたらない。近年、体外受精技術が開発されて、雌生殖器内での受精現象の機構解明や、受精成立に関する諸要因の解析さらにその再現が可能となってきた。そこで、本節では体外受精を実施するにあたり基礎的知見を得るためにウシ精子の種雄牛による個体差の有無について検討した。

これまでに、液状精液または凍結精液を用いた実験で、体外受精による受精率が個体によって変動することは多くの研究者によって報告されている。本節の結果でも13.5～100%と個体によって大きく変動していた。種雄牛19と20のように他の種雄牛に比較して有意に低い成績を示した個体もみられたが、今回用いた種雄牛の野外での人工授精率は、全ての個体で正常の値を示していた。これは、体外受精での受精率の差異は精子前培養処理に対する精子の感受性の差異と考えられるため、今回の体外受精条件が種雄牛19や20の精子の受精能獲得にとって有効ではなかったためと考えられる。今回用いた精子は、凍結融解直後の精子活力が40+++以上の良好な成績であったが、19と20についてはプレインキュベーション後の活力の低下が著しく、それが受精率の低下に影響したものと考えられる。福島ら(1986)とOhgoda et al.(1988)は、種雄牛の人工授精後の受胎成績と体外受精成績との間に明確な関係がみられなかったと述べている。しかし、Hillery et al.(1990)は、人工授精による受胎率で $78\pm 1\%$ と $66\pm 1\%$ の2つのグループの体外受精率とその後の胚発生率を検討し、人工授精による受胎率は体外受精の総受精率を反映しているが単精子受精である正常受精率に差はないとしている。また、分割率では有意差は認められないが、桑実胚から胚盤胞までの発生率では両者間に有意差を認めており人工授精

精子による受精能がこのよに人工授精と体外受精において一致する場合もある。しかし、体内での精子環境とは異なり、人為的に受精能を誘起された精子を用いた体外受精条件での結果をその精子の受胎能の示標とすることは短絡的と考えられた。

多精子侵入率は、種雄牛によって45.7%という高い値を示す個体もみられた。実際には、多精子侵入卵では受胎および正常な産子が望めないことを考慮すると、単に受精率の上昇のみを考えるだけでは最適な体外受精環境と言うには不十分といえる。そこで、種雄牛毎に精子濃度、精子前培養時間および受精後の培養液交換までの時間などを検討して、多精子侵入卵の出現の出現の少ない、高い受精率の得られる条件を確立する必要があると思われた。

実験2で、受精率に有意差がなかった種雄牛1～15においては、4細胞期以上に発生する胚の割合においても有意差が認められなかったが、種雄牛19と20のように低い受精率を示す個体においては、4細胞期以上胚発生率についても他の種雄牛に比較して低かった($P<0.05$)。このように、受精率の低い個体では、胚の発生の引金となる受精の割合が低いことため4細胞期以上胚率も低くなったと考えられた。そこで、受精率の極端に低い種雄牛は、体外受精に用いないか、その種雄牛に適合した他の精子処理条件を考えるべきである。Table 3-2の受精卵の胚発生率は、Table 3-1、2の結果から受精後の胚発生率を検討したものである。すなわち、計算上の受精卵数に対する4細胞期以上胚数の割合である。その結果、種雄牛1～20の受精卵の受精卵の胚発生率が同程度の値となった。このことは、受精以後の胚発生は種雄牛個体差による精子側の要因に影響されないことを示唆した。

IV 摘要

種雄牛ごとの体外受精率およびその後の胚発生能の差を比較した。

体外受精の受精率には種雄牛による個体差があるが、受精率の低い個体は4細胞期以上への胚発生率も低く、特に受精率が極端に低い(20%以下)個体の精子は体外受精には使

用すべきではないと考えられた。さらに、計算上の受精卵の胚発生成績を検討したところ、全ての種雄牛において受精卵の4細胞期胚への発生率が同程度であり、受精以後の胚発生は種雄牛個体差による精子側の要因に影響されないことを示唆した。

第3節 ウシ精子前培養時のHeparinおよびCaffeineの添加が体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響

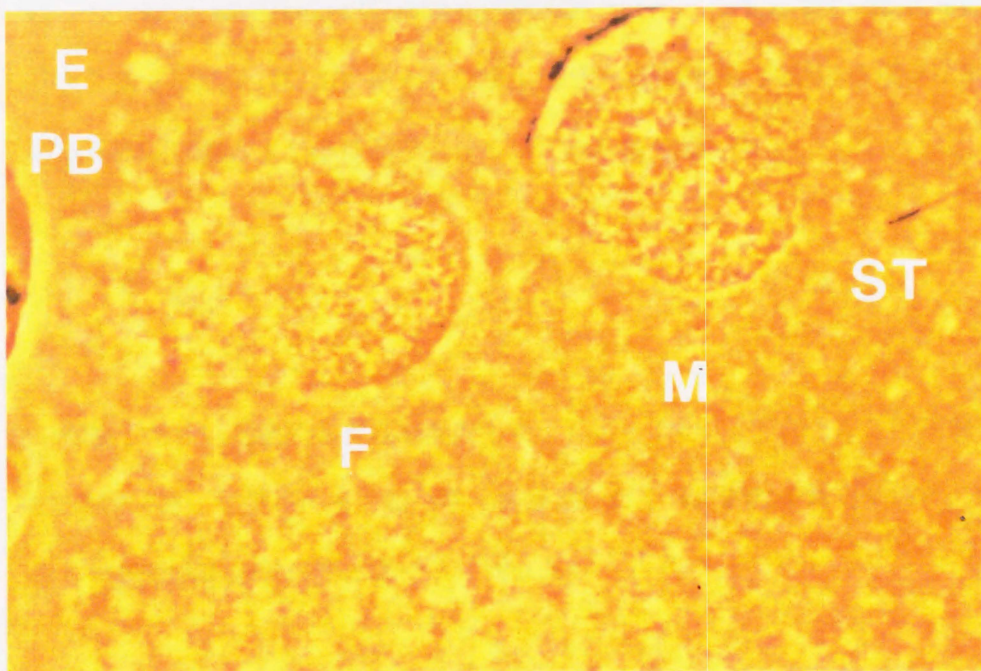
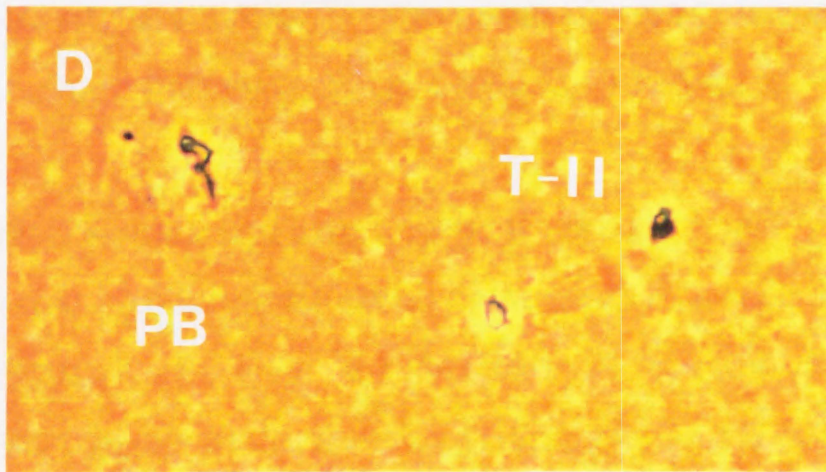
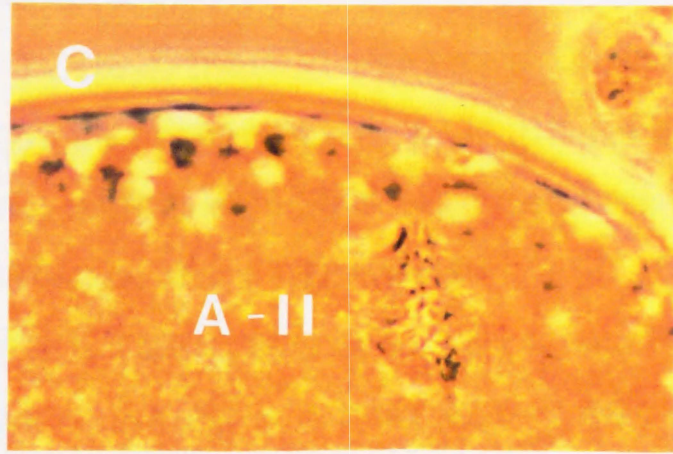
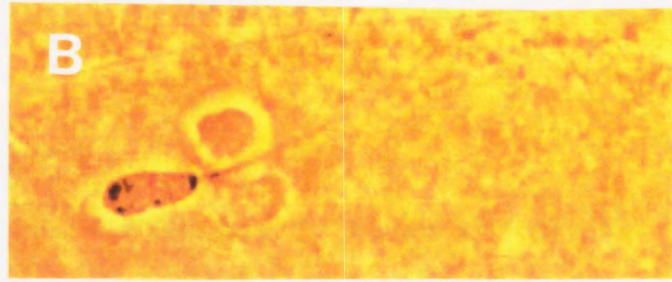
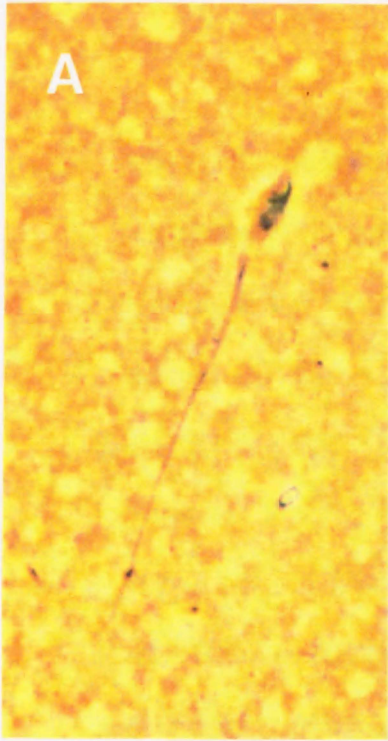
第2節では体外受精において同一前培養条件で精子を処理した場合に種雄牛の個体による差がみられることを明らかにしたが、普遍的な正常受精卵率の高い精子処理条件を確立することは、ウシ体外受精胚の発生率を高めるうえで重要な要因と考えられる。これまで、化学的に明らかな合成培地を用いたウシの体外受精における精子の受精能獲得誘起には、高イオン強度（以下HIS処理とする）、イオノホアA-23187（以下I-A処理とする）、Heparin（以下Hepとする）、Caffeine（以下Cafとする）や高濃度精子前培養等の処理を用いることによって可能となり、これらの方法によって得られた精子を使った体外受精胚から産子が得られている（Brackett et al.;1982、花田ら;1986、Critser et al.;1986、Goto et al.;1988、Shioya et al.;1989、Utsumi et al.;1991）。最近Hepを用いた系の報告が多くみられるようになった（Lu et al.;1988、Xu et al.;1988、Fukui and Ono;1989、Fukui et al.;1990、Fukui;1990）。一方、Niwa and Ohgota(1988)は、HepおよびCafを併用した場合に個体によっては受精率が改善される場合のあることを示している。また、種々の精子処理の後に精子侵入の経時的変化を検討した報告がHep処理ではXu and Greve(1988)、HepとCaf処理ではPark et al.(1989)と高濃度精子前培養処理ではSaeki et al.(1991)によってなされているが、精子処理方法によってその経過は必ずしも一致していない。そこで、本節ではBSAを添加したB0液へのHepおよび、またはCafの添加が受精率およびその後の胚発生能に及ぼす影響、CafおよびHep添加処理精子の侵入経過と精子前培養の必要性を明らかにするために実施した。

I 材料および方法

卵母細胞の準備、体外受精に関する基本操作は本章、第2節に準じた。

Fig. 3-2. Various stages of fertilization in vitro of bovine follicular oocytes.

- A) The penetrating spermatozoon with detached tail in vitellus. Sperm head is still intact. The oocytes was fixed and stained 2h after insemination. ×400.
- B) The penetrating spermatozoon in vitellus. Sperm head is partially enlarged with detached tail. The oocyte was fixed and stained 4h after insemination. ×400.
- C) An oocyte at anaphase-II, fixed 2h after insemination. ×400.
- D) An oocyte at telophase-II with polar body (PB), fixed 4h after insemination. ×400.
- E) An oocyte with male (M) and female (F) pronuclei, second polar body (PB) and sperm tail(ST). ×400.



実験1：精子前培養時間の検討

凍結精液を37℃で融解し、5mg/mlのBSA、2.5mM Cafと10μg/ml Hepを添加したB0液（glucoseを除いた）で2回洗浄後、最終精子濃度を 12.5×10^6 /mlとして、35mmシャーレ（Falcon）内に流動パラフィン（Merck）下の100μlのドロップとして、0、2.5および5時間前培養した。成熟の完了した卵母細胞を精子浮遊液中へ導入して授精し、6時間後に発生培地に移し代えた。授精10～12時間後に卵子を受精率の検査のために固定染色した。

実験2：精子前培養液へのHepとCaf添加による相互作用の検討

2頭の種雄牛の凍結精液を用い、試験区は、BSA(2.5mg/ml)を加えたB0液にHep濃度0および10μg/mlとCaf濃度0、2.5および5mMを組み合わせた6区を設定した。実験1と同様に処理し、前培養時間は5時間とした。授精18時間後に一部を受精率の検査のために固定染色した。残りは授精72時間後に分割率をさらに7～8日後の胚盤胞期への発生率を検討した。

実験3：HepあるいはCafを添加したB0液で前培養した精子の卵子への侵入経過

2.5mg/ml BSAを含んだB0液に5mM Cafまたは10μg/ml Hepを加えた3区で実験2と同様の精子処理を行った。その後、精子の侵入状況を2、4、6、8、10、12、15および18時間目に固定、染色後に検卵し、精子処理と受精状況を検討した(Fig. 3-2)。受精卵の分類は、Iritani and Niwa(1977)に準じ、侵入精子を伴った第2減数分裂後期、侵入精子を伴った第2減数分裂終期、侵入した膨化精子と雌性前核、雌雄両前核と精子尾部の認められた両前核期および多精子侵入卵のいずれかに分類した。

II 結果

実験1では前培養の必要性を検討した。Table 3-3に示すように、前培養を2.5または5時間行った区で精子の侵入像が早く観察された。最終的な正常受精率と多精子侵入卵を含んだ総受精率は各区間に差はみられなかった。

Table 3-3. Effect of sperm preincubation time for capacitation and insemination on the fertilization of bovine oocytes matured in vitro

Pre-incubation time (hours)	Fixation after insemination (hours)	No. of oocytes									
		Examined	GV ~ T-I	M-II	A-II ~ T-II	Monospermy(%)				Poly-spermy Both PN	
						Total	A-II	T-II	SH		
0	2	23	0	15	0	0(0.)	0	0	0	0	0
	3	32	9	21	0	2(6.3)	1	1	0	0	0
	4	28	4	16	0	8(28.6)	0	6	2	0	0
	18	64	1	4	1	47(73.4)	0	0	0	47	11
2.5	2	20	7	12	1	0(0.)	0	0	0	0	0
	3	30	7	10	1	12(40.0)	0	12	0	0	0
	4	32	3	6	0	23(71.9)	0	17	6	0	0
	18	61	3	8	1	37(60.7)	0	1	0	36	12
5	2	21	6	11	1	1(4.8)	0	0	0	0	0
	3	30	4	10	0	16(53.3)	0	16	0	0	0
	4	30	2	3	2	22(73.3)	0	15	7	0	1
	18	62	3	4	3	37(59.7)	0	0	0	37	15

GV:germinal vesicle, T-I:telophase I, M-II:metaphase II, A-II:anaphase II, T-II:telophase II, SH:enlarged sperm head and female pronucleus, Both PN:male and female pronuclei.

Table 3-4. Effect of heparin and/or caffeine pretreatment of sperm on the fertilization of bovine oocytes

Bull name	Conc. of		No. of trial	No. of oocytes		
	Heparin (μ g/ml)	Caffeine (mM)		Examined	Fertilized (%)	Polyspermy (%)
Bull A	0	0	3	68	28 (41.2) ^d	1 (3.6) ^d
	0	2.5	3	67	45 (67.2) ^c	2 (4.4) ^{c,d}
	0	5	3	75	62 (82.7) ^{a,b}	9 (14.5) ^{b,c}
	10	0	3	90	69 (76.7) ^{b,c}	15 (21.7) ^{a,b}
	10	2.5	3	85	75 (88.2) ^{a,b}	14 (18.7) ^{a,b}
	10	5	3	84	72 (85.7) ^{a,b}	22 (30.6) ^a

Bull B	0	0	3	58	20 (34.5) ^c	1 (5.0) ^b
	0	2.5	3	62	27 (43.5) ^c	2 (7.4) ^b
	0	5	3	58	37 (63.8) ^b	3 (8.1) ^b
	10	0	3	73	62 (84.9) ^a	7 (11.3) ^b
	10	2.5	3	75	63 (84.0) ^a	18 (28.6) ^a
	10	5	3	72	62 (86.1) ^a	18 (29.0) ^a

a,b,c,d: The same superscripts are not significantly different in the same cylinder (P<0.05).

Table 3-5. Effect of heparin and/or caffeine pretreatment of sperm on the fertilization and subsequent development of bovine oocytes.

Bull name	Conc. of		No. of trials	Examined	No. (%) of embryos		
	Heparin ($\mu\text{g/ml}$)	Caffeine (mM)			2 day		7-8days
					1-7cell	8-cell	Blastocyst
Bull A	0	0	3	72	63	9 (12.5) ^d	10 (13.9) ^b
	0	2.5	3	59	48	11 (18.6) ^{c d}	8 (13.6) ^b
	0	5	3	77	56	21 (27.3) ^{b c}	19 (24.7) ^{a b}
	10	0	4	147	95	55 (37.4) ^{a b}	39 (26.5) ^a
	10	2.5	4	132	77	55 (41.7) ^a	48 (36.4) ^a
	10	5	4	123	72	51 (41.5) ^a	39 (31.7) ^a
Bull B	0	0	3	95	91	4 (4.2) ^d	2 (2.1) ^b
	0	2.5	3	93	81	12 (12.9) ^{c d}	10 (10.8) ^a
	0	5	3	78	60	18 (23.1) ^{a b c}	14 (17.9) ^a
	10	0	4	103	77	26 (25.2) ^{a b}	16 (15.5) ^a
	10	2.5	3	100	67	33 (33.0) ^a	19 (19.0) ^a
	10	5	3	99	77	22 (22.2) ^{b c}	13 (13.1) ^a

a,b,c,d: The same superscripts are not significantly different (P<0.05).

実験2：Table 3-4に示すように、受精率は、種雄牛A、BともにHepのみおよびCafのみの添加によって対照区に比較して有意に高かった($P<0.05$)。Hep無添加区ではCaf添加量に依存して受精率が上昇したが、Hep添加区でのCafとの相乗効果は認められなかった。

Table 3-5は分割率、胚盤胞率を示している。受精7～8日目の胚盤胞率も受精率と同様に種雄牛A、BともにHepのみ、およびCafのみの添加によって対照区に比較して有意に高かった。

Table 3-6およびFig. 3-3～3-6は、実験2の受精卵率の時間的推移を示している。Fig. 3-3に示すように、無添加区が他の2区に比較して有意に低い受精率を示して推移した。Caf処理区は当初6時間目まではHep区に比較して有意に受精率が低かった($P<0.05$)が、10時間以後では同様なやや高い値で推移した。Fig. 3-4は侵入精子を伴った第2減数分裂終期卵の出現率の推移を示している。Caf区、Hep区では最初の出現は、2時間目から認められたが無添加区では4時間目以後であった。総受精率の場合と同様にCaf区に比較してHep区の割合が高く推移していた。Fig. 3-5は、雌雄両前核卵の出現率の推移を示している。Caf区、Hep区では6時間目から認められ、ほぼ同様の出現率を示して推移したが、無添加区では8時間目に初めて出現し、以後他の2区に比較して有意($P<0.05$)に低い値を示して推移した。Fig. 3-6は、雌性前核期胚の出現率を示している。Fig. 3-5に示されるように既に受精の6時間目から両性前核期胚が出現しているが、無添加区では8～15時間目で、Caf区では8～10時間目にかけて6～12%の雌雄両性の同期化しない胚が認められたが、Hep区では、常に6%未満の低い値で推移した。多精子侵入卵は、CafとHep区で高い傾向を示した。

Ⅲ 考察

精子受精能獲得の誘起方法は種々の方法が報告されている。今回検討したCaf処理はGoto et al.(1988)やShioya et al.(1989)がまた、Hep処理はParrish et al.(1985, 198

Table 3-6. Developmental stages of oocyte and spermatozoa chromatin after insemination in vitro

Treatment	Time after insemination (hours)	No. (%) of oocytes						
		Examined	Fertilized	Ana-phase II	Telo-phase II	Female* pro-nucleus	Both pro-nuclei	Poly-spermy
None	2	66	0	0	0	0	0	0
	4	57	9 (16)	2	7	0	0	0
	6	68	20 (29)	0	19	0	0	0
	8	68	29 (43)	0	12	4	13	0
	10	59	27 (46)	0	6	5	15	1
	12	57	32 (56)	0	2	5	24	1
	15	81	40 (49)	0	5	5	27	0
	18	71	36 (51)	0	0	1	33	2
Caffeine	2	64	13 (20)	2	11	0	0	0
	4	63	36 (57)	1	33	0	0	0
	6	67	45 (67)	0	32	0	13	0
	8	64	51 (80)	0	8	8	31	4
	10	56	50 (89)	0	3	6	35	6
	12	61	56 (92)	0	0	2	48	6
	15	69	60 (87)	0	4	0	51	4
	18	77	76 (99)	0	0	1	56	19
Heparin	2	66	27 (41)	0	27	0	0	0
	4	60	41 (68)	0	41	0	0	0
	6	63	52 (83)	0	38	0	12	2
	8	71	62 (87)	0	9	4	41	8
	10	56	48 (86)	0	0	1	41	6
	12	58	51 (88)	0	0	1	39	11
	15	78	66 (85)	0	4	0	52	9
	18	68	65 (96)	0	1	1	47	16

*:Female pronucleus with enlarged sperm head and detached tail.

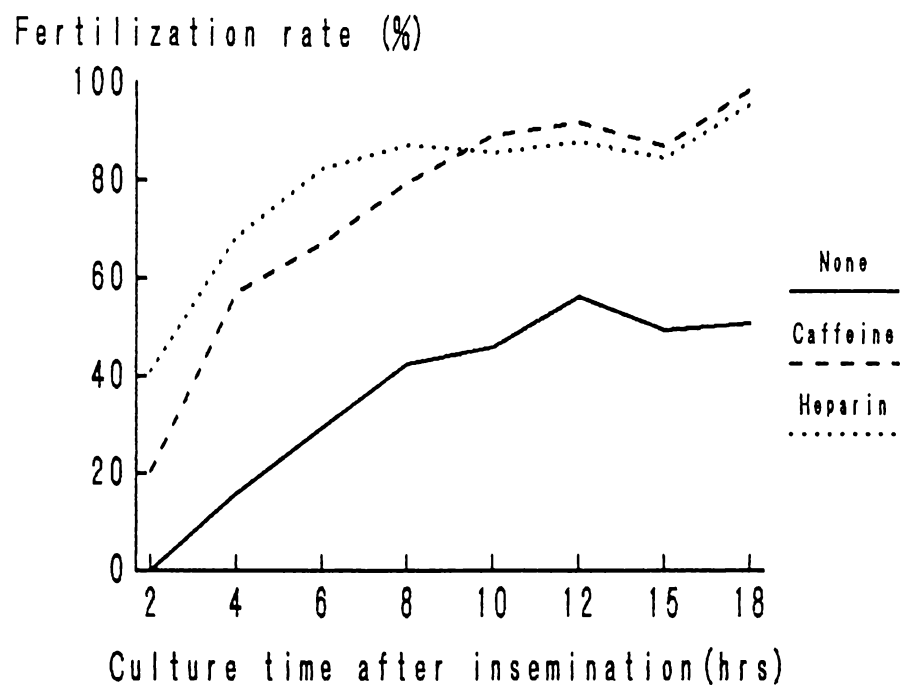


Fig. 3-3. Fertilization rates of bovine oocytes matured and fertilized in vitro.

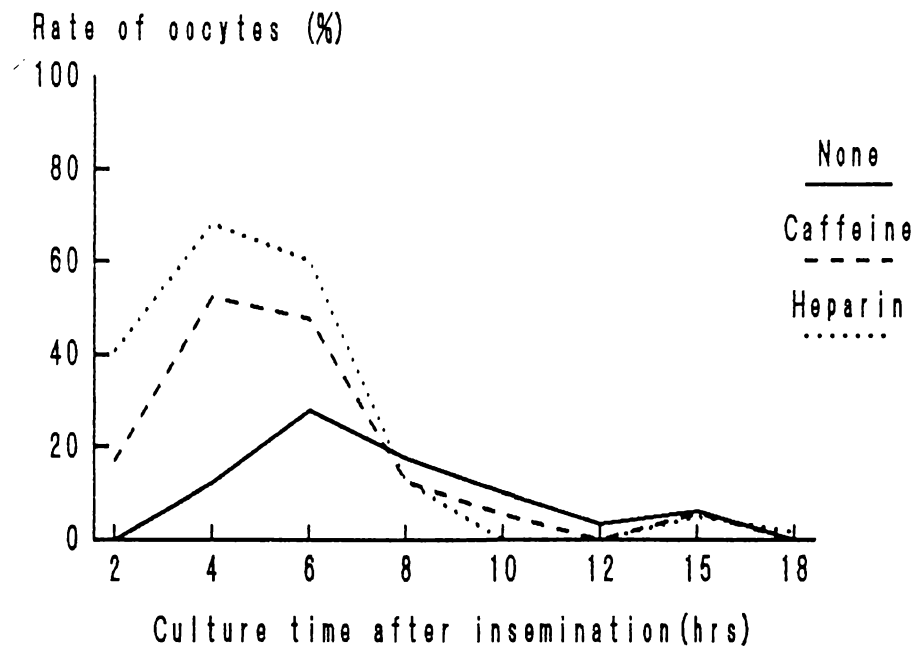


Fig. 3-4. Telophase-II stage oocytes
matured and fertilized in vitro

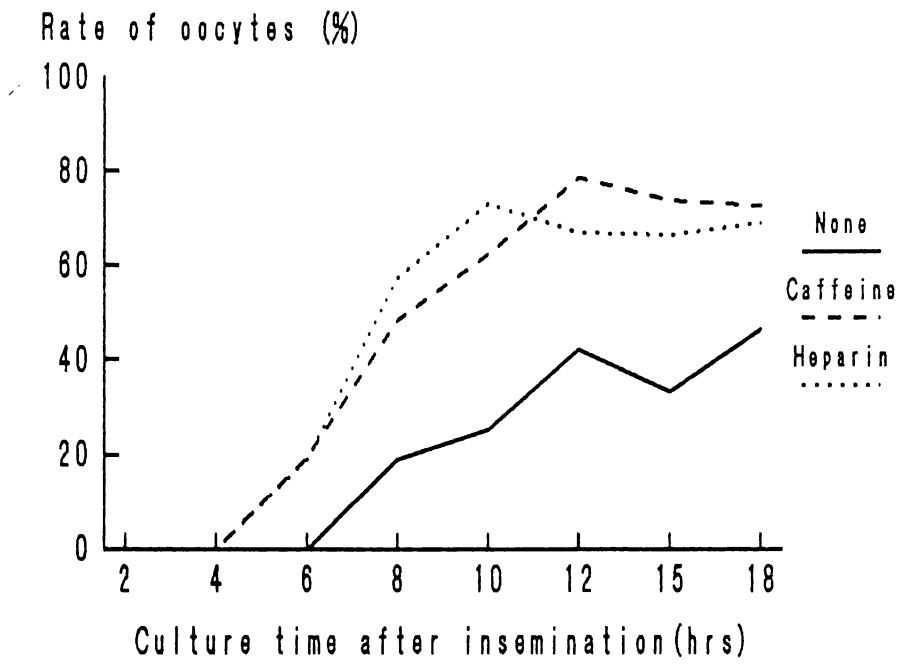


Fig. 3-5. Pronuclear oocytes matured and fertilized in vitro.

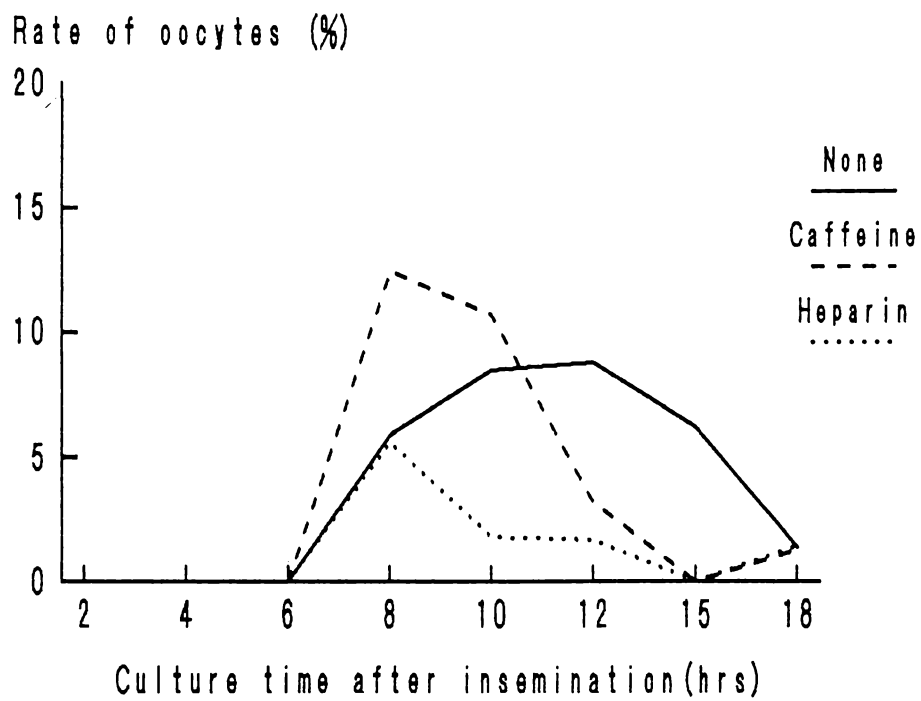


Fig. 3-6. Oocytes matured and fertilized in vitro having enlarged sperm head and female pronucleus.

6,1988,1989)、Fukui et al.(1990)他により報告されている。

精子前培養は体外受精の受精時間の同期化にとっては重要であり、精子侵入時間を均一に揃えて正常な受精を期待するためには、2.5時間程度の精子前培養が必要であることが示された。Parrish et al.(1988)は、TALPを用いた受精条件であるが、10mM Hepで4時間前培養した場合においても電子顕微鏡的に先体反応は始まっておらず、Lysophosphatidylcholineを100 μ g/ml添加することによって15分で同期化すると報告している。Hepを授精培地中に添加する本実験系とは条件が異なるが、卵母細胞との共培養までの条件はほぼ同一であることから、本実験で前培養を行わない区は、卵母細胞との共培養の中で受精能獲得誘起が行われたものと考えられた。

2頭の種雄牛の精液を用いて検討したところ、両種雄牛ともにCafまたはHepによって精子受精能獲得が誘起され有意に受精率が高くなっただけでなく($P<0.05$)、受精後の胚発生率においてもCafまたはHep処理によって有意に高くなった($P<0.05$)。これは、Caf、Hep処理で正常受精卵率が高くなることが胚盤胞率に反映したのと考えられた。

Niwa and Ohgoda(1988)は、Hep単独処理に比較してHepにCafを併用した場合に受精率が上昇することから、併用により相乗効果があると述べている。種雄牛間の個体差を考慮する必要があるが、本試験の結果からは明確な相乗効果は認められなかった。今回使用した種雄牛の受精率が80%以上と高かったことが、ここでの相乗効果が明確とはならない原因の1つと考えられた。

CafとHep処理精子の受精への関与を明らかにするために、Caf、Hepまたは両者を無添加のB0液で精子処理をした場合の受精卵の出現率の時間的な推移を検討した。授精18時間後の最終的な受精率は90%以上とHepまたは、Caf添加区で差は認められなかったが、2～6時間目までは時間毎の受精率はHep区がCaf区より高く、両者間に有意な差が認められた($P<0.05$)。このように受精過程の経過はCaf処理精子に比較してHep処理精子で侵入経過が早いことから、Cafに比較してHepがより直接的に受精能獲得に関与していると考えられた。これが、後の胚発生に良い影響をもたらすと思われた。

Park et al.(1989)は、HepとCafを併用した処理区ではあるが授精の3時間後から雄性前核を、授精の4時間後には雌雄両前核を観察している。Hep処理区ではXu and Greve(1988)が受精像は6時間目から観察されはじめ、8時間以後に雌雄両前核を確認している。Saeki et al.(1991)は、3時間後から精子侵入像をさらに7時間後から雌雄両前核を確認している。本実験では、Saeki et al.(1991)に比較して1時間程度侵入が早く認められたが精子侵入と雌雄両前核の出現がほぼ同様の時間的推移を示していた。また、体内での侵入を検討したHyttel et al.(1987)の、排卵後4時間で精子侵入、5～7時間で雌雄両前核を観察したという報告と一致しており、良好な精子処理であったと考えられた。

雄性前核が形成されずに、膨化精子頭部を伴った雌性前核期胚の出現が、Hep処理区では6%未満であったが、無添加区とCaf区では6～12%出現した。これは、無添加区やCaf区での体外受精では、雌雄の核の同期化が完全に行われないことを示唆しており、Hep処理が他の区に比較して正常な受精能獲得を誘起していると考えられた。

これまでに、マウス精子の受精能獲得にCafが関与していることはFraser(1979)によって報告されている。その作用機序は、cyclic nucleotide phospho diesteraseの作用を抑制し、精子のcAMP量の上昇をもたらし、先体反応に関与するとされている(高橋と花田;1984)。一方、Handrow et al.(1982)やParrish et al.(1985)は、Hepなどコンドロイチン硫酸が受精能獲得に深く関わっていることを示唆している。最近の研究でマウス精子受精能獲得に Ca^{2+} イオンが関与することが示され(Fraser;1987)また、 Ca^{2+} の代謝に関わっているcalmodulineが、家兎やguinea pig 精子頭部上半分に証明された(Jones et al.;1980)。さらに、ウシ精子でcalmoduline結合蛋白質がHepに親和性が高いことからHep量の増加に従ってcalmoduline結合蛋白質が減少し、これと反比例して受精率が上昇することからHepが受精能獲得に大きく影響を及ぼしていることを明らかにしたLeclerc et al.(1990)の報告は、今回の結果を支持した。また、Hep結合蛋白質がウシ精子表面に存在することも明らかとなっておりウシ精子の受精能獲得および先体反応に大きく関わっていると示されている(Hurst et al.;1988,Miller et al.;1990)。

以上から、胚発生率を高めるためには、受精時に雌雄前核の同期化の行なわれることが重要であり、Hepを中心とした前培養処理によって胚発生率を改善できることが明らかとなった。

IV 摘要

BSAを添加したB0液へのHepとCafの添加が受精率およびその後の胚発生能に及ぼす影響、CafおよびHep添加処理精子の精子侵入と精子前培養の必要性を明らかにするために実施した。

精子の前培養処理は、受精時間の同期化には重要であり、2.5～5時間の前培養が必要であることが示された。CafまたはHepの添加によって受精率および授精の7～8日目の胚盤胞期胚の発生率が有意に増加した($P<0.05$)。これは、両処理によって正常受精卵率（単精子受精卵率）が増加したことが反映されたものと考えられた。また、HepとCafを使用した場合の相乗効果はみられなかった。

最終的（授精18時間）な受精率ではCaf処理区とHep処理区で差はないものの、受精初期の過程ではHep処理精子の侵入経過が早く、Cafに比較してHepが直接的に受精能獲得および先体反応に関与していることが明らかとなった。

第4節 小括

体外成熟したウシ卵子を用いて、高い受精率とその後の発生率を得るために、第3章ではウシ精子の前培養条件を検討した。

第2節では、種雄牛ごとの体外受精率およびその後の胚発生能の差を比較検討した。体外受精の受精率は種雄牛による個体差があり、受精率の低い個体は4細胞期以上への胚発生率も低く、特に受精率が極端に低い(20%以下)個体の精子は体外受精には使用すべきではないと考えられた。さらに、計算上の受精卵の胚発生成績を検討したところ、全ての種雄牛において受精卵の4細胞期胚への発生率が同程度であった。このことは、受精以後の胚発生は種雄牛個体差による精子側の要因に影響されないことを示唆した。

第3節では、ウシ精子前培養時のHepおよびCafの添加が体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響を検討した。精子の前培養処理は、受精時間の同期化には重要であり、2.5～5時間の前培養が必要であることが示された。CafまたはHepの添加によって受精率および授精の7～8日目の胚盤胞期胚の発生率が有意に増加した($P<0.05$)。これは、両処理によって正常受精卵率(単精子受精卵率)が増加したことが反映されたものと考えられた。また、HepとCafを使用した場合の相乗効果は、みられなかった。最終的(授精18時間)な受精率ではCaf処理区とHep処理区で差はないものの、受精初期の過程ではHep処理精子の侵入経過が早く、Cafに比較してHepが直接的に受精能獲得および先体反応に関与していることが明らかとなった。以上より、胚発生率を高めるためには、受精時に雌雄前核の同期化の行われることが重要であり、Hepを中心とした前培養処理によって胚発生率を改善できることが明かとなった。

第4章 ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存

第1節 緒言

体外受精・体外培養によって作出されたウシ胚盤胞の移植で、効率的な子牛の生産を行うには、安定した凍結保存技術の確立が望まれる。しかし、ウシ体外成熟・体外受精卵の体外培養による胚盤胞への発生の成功（梶原ら;1987、Fukuda et al.;1990）から歴史が浅く、その凍結保存に関する研究も少ない。これまで報告された凍結融解後の生存率は高くても70%前後である（梶原ら, 1988b; 米谷ら, 1989）。一方、体外受精卵を家兎卵管内に仮移植することによって得られた胚盤胞は供胚牛から回収した胚盤胞と同程度の凍結融解後の生存性を得ており（Utsumi et al.;1991）、体外受精後の培養条件によって胚の耐凍性が左右されることが考えられる。しかしながら、これまでにウシ体外受精・体外培養胚盤胞の耐凍性を供胚牛から回収した胚盤胞のそれと比較して、その特性を明らかにした報告はない。応用的な実施例において、ウシ体外受精・体外培養胚の作出は近年急激に増加し、その移植、出産も報告されているが（梶原ら;1987, Goto et al.;1988, Lu et al.;1988, 湊;1989, Fukuda et al.;1990, Gordon and Lu;1990）、これを凍結保存する場合の最適凍結曲線を詳細に検討した報告はない。

本章では、第2節で体外受精・体外培養法で得られた胚盤胞の特性を明らかにして、凍結方法を確立させるために、体外受精後、体外培養で得られた胚盤胞と家兎卵管内培養で得られた胚盤胞の耐凍性を比較検討した。次に、第3節では体外受精後に体外培養で作出された胚盤胞の生存性に及ぼす冷却速度および液体窒素中への浸漬温度の影響について検討した。さらに第4節では、これら凍結・融解胚のストロー内glycerol除去の応用を検討した。

第2節 体外受精後、体外および家兎卵管内で培養されたウシ胚盤胞の耐凍性の検討

体外受精卵を家兎卵管内に仮移植することによって得られた胚盤胞は供胚牛から回収した胚盤胞と同程度の凍結融解後の生存性が得られている(Utsumi et al.;1991)。しかしながら、体外受精後に体外培養によって得られた胚盤胞の耐凍性が供胚牛から回収されたものよりも劣るという報告がある(上田ら;1989)。以上のことは、体外受精卵であってもその後の培養環境によっては、それぞれの胚盤胞の耐凍性に差があることを示唆している。マウスでは体内受精後体外または体内で培養した胚の凍結融解後の生存性に差がなかったと報告されている(Pellicer et al.;1989)が、ウシ胚に比較して培養時間も短いため同一水準で比較することはできない。

そこで、本節では、体外受精・体外培養によって作出された胚盤胞の胚の品質と凍結能との関係を明らかにするために、体外受精後に体外または家兎卵管内で培養されたウシ胚盤胞を用いて培養環境が耐凍性に及ぼす影響を明らかにすることを目的に実験を行った。

I 材料と方法

1 胚盤胞の作出

1) 卵母細胞の体外成熟

卵母細胞の成熟は、第2章、第3節と同様にした。

2) 体外受精

当场繫養の種雄牛の1頭から採取した同一ロットの凍結精液を用いた。0.5mlのプラスチックストロー内凍結精液は37℃の温湯中に15秒間浸漬して融解し、小試験管内に移した。2.5mM caffeine (安息香酸ナトリウムcaffeine、Sigma)、10 μ g/ml heparin

(Sigma)および2.5mg/ml牛血清アルブミン (Fraction V、Sigma) を含むB0液(glucoseを除いたものを使用した) 7mlを加え、遠心分離 (750G、5分間) により2回洗浄した。その後、B0液で精子濃度を 5×10^6 /mlに調整した。精子浮遊液をシャーレ (35mm、Falcon) 内に100μlの小滴にして分注し、ただちに滅菌流動パラフィンで覆い、加湿型炭酸ガス培養器内 (5%CO₂、95%空気、39℃) で2~3時間プレインキュベーションした。授精はこの精子浮遊液中に、成熟培養の終了した卵母細胞をB0液で洗浄後、導入して行った。

3) 体外受精卵の培養

体外受精卵は授精の5時間後、発生培地に移して培養した。発生培地は25mMヘース緩衝TCM-199(GIBCO)に、1%新生子牛血清 (三菱化成 (株)) と抗生物質 (100iu/ml結晶ペニシリンGカリウム、100μg/ml硫酸ストレプトマイシン、明治製菓) を加えた。授精後48時間目に胚をピペット操作により裸化し、2群に等分して以下の処理を行った。

a) 体外培養

胚 (4~8細胞期) は、遊離した卵丘細胞と共に100μlの培地ドロップ内で培養を継続した。培地の交換は48時間毎に行い、授精7日目に発生した胚盤胞を凍結試験に用いた。

b) 家兎卵管内への仮移植

花田(1985)の方法に従って授精後48時間目の胚 (4~8細胞期胚) をhCG処理後48時間目の家兎の結紮卵管内に仮移植した。5日後 (授精7日目) に卵管を摘出し、m-PBSで下降性に灌流して回収した胚盤胞を供試した。

2 体外受精胚の凍結

凍結は冨永ら (1985) の方法に従って行った。凍結基礎媒液には33%新生子牛血清を含むリンゲル氏液、耐凍剤には1.4M glycerolを用いた。胚盤胞は、glycerolを0.47M含む凍結基礎媒液に5分、0.93M含む液に5分および最終濃度である1.4M含む液に3分間それぞれ

れ37℃で浸漬して、glycerol平衡を行った。glycerol平衡を終了した胚盤胞は、0.25ml ストロー中に封入し、プログラムフリーザー（大阪酸素製FFP190）を用いて凍結した。凍結プログラムは、-2.5℃で自動植氷し-5.2℃で15分保持した後、-21℃～-39℃の冷却温度域を3℃毎、7区の温度域まで0.3℃/分で冷却して、各温度に到達後に-160℃まで急冷し、液体窒素（以下LN₂とする）に直接浸漬して保存した。

3 凍結胚の融解、生存および発生検定

凍結胚盤胞は37℃の温湯中に15秒間ストローを浸漬して融解した。1.4Mから0.23Mずつ薄くなる6段階の濃度のglycerolを含む凍結基礎媒液中へ胚を段階的に37℃で5分間ずつ移しかえてglycerolを除去した。胚盤胞を発生培地で洗浄後、シャーレ（35mm、Falcon）内の100μl発生培地内で培養した卵丘細胞単層と共培養して24時間までに胞胚腔の回復した形態的に正常な胚盤胞を生存胚とした。また、培養48時間後に脱出胚盤胞に発生した胚を発生胚として記録した。凍結・融解後の生存率と発生率の有意差検定は χ^2 検定で行った。

II 結 果

Fig. 4-1に示すように、家兎卵管内培養胚盤胞は、-24℃～-36℃の広いLN₂浸漬温度で高い生存率を示した。体外培養胚盤胞は-30℃の浸漬温度でのみ家兎卵管内培養胚盤胞に匹敵する高い生存率を示し、-27℃と-36℃の浸漬温度では家兎卵管内培養胚の生存率より有意に低かった($P<0.05$)。発生率についても両群の胚で生存率と同様の傾向を示した。

III 考 察

Lehn-JensenとGreve(1982)は供胚牛から回収した胚盤胞を0.3℃/分で冷却した場合、

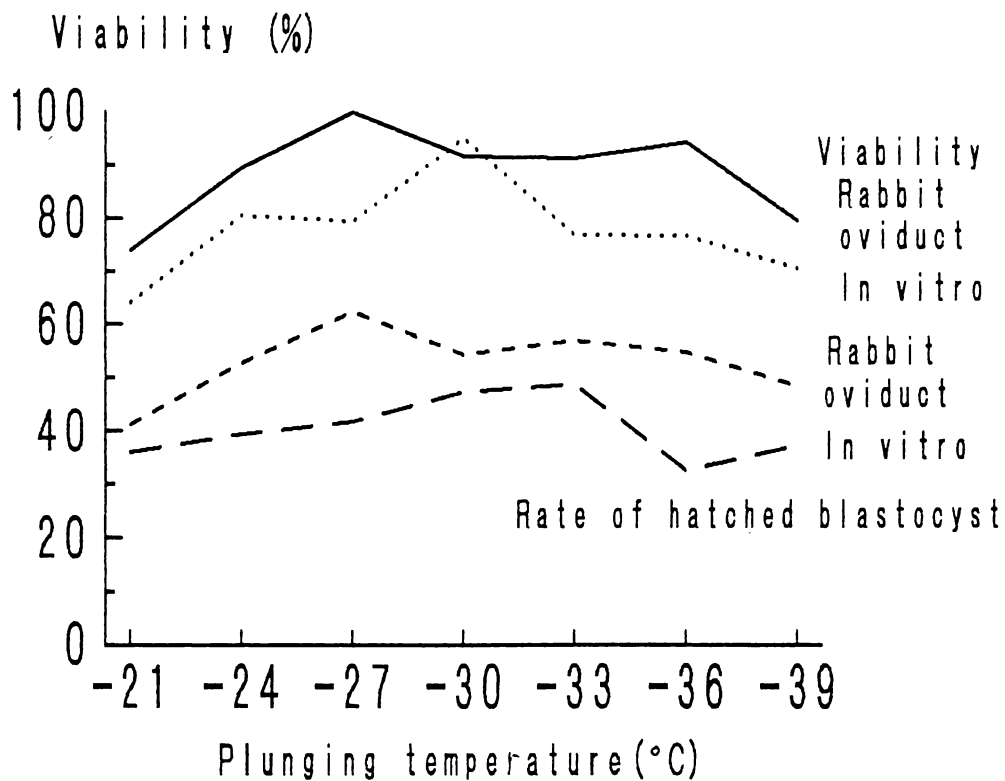


Fig. 4-1. Relationship of plunging temperature and viability of post-thawing bovine embryos matured and fertilized in vitro, and developed in vivo or in vitro.

The number of replicate samples and the total number of blastocysts recovered after thawing (in parentheses), starting with samples plunging at -21°C, were 2(23), 2(38), 3(32), 2(24), 2(23), 2(54) and 2(39) for rabbit oviduct; and 3(39), 2(41), 3(39), 3(42), 3(61), 2(56) and 3(61) for in vitro culture.

高い生存率の得られるLN₂浸漬温度域は-20℃~-35℃であったと報告している。一方、Iwasaki et al.(1990a)は体外成熟・体外受精後に家兎卵管内培養した胚盤胞の内細胞塊の形態と細胞数は供胚牛より回収された胚盤胞のそれらと近くなることを認めている。本研究で得られた体外成熟・体外受精・家兎卵管内培養胚盤胞の耐凍性は、Lehn-Jensen and Greve(1982)の供胚牛から回収した胚盤胞の結果とよく一致した(Fig. 4-1)。しかしながら、体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞の耐凍性はそれらとは異なり、家兎卵管内培養胚盤胞に匹敵する高い生存性の得られるLN₂浸漬温度域は狭かった。これは、体外培養胚盤胞は凍結冷却時の脱水に伴う収縮や融解加温時の復水に伴う膨化による物理的衝撃に対する細胞膜の抵抗性が低いこと、また凍結冷却過程での脱水に伴う塩濃縮に対する抵抗性も低いことを示している。

体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞はその内細胞塊が形態的に変性過程にあること(Iwasaki et al.;1990b)や、細胞膜が過酸化によって傷害を受けている可能性のあること(第2章第4節,Nakao and Nakatsuji;1990)が報告されている。このような内細胞塊の変性や細胞膜の過酸化が本実験における体外培養胚盤胞の耐凍性の低下の一因かもしれない。

マウスでは、交配した過剰排卵誘起雌から回収した2細胞期胚を体外培養して得られた胚盤胞の凍結融解後の生存率は、51%で交配した過排卵誘起雌から回収した胚盤胞の33%と有意差のないことが示されている(Pellicer et al.;1989)。しかし、ウシではマウスに比較して体外培養時間が長いため、先に述べたように体外培養胚盤胞については不適當な培養条件による品質の低下が考えられる。このことは、本研究で示した方法で得られる体外受精・体外培養胚盤胞を凍結保存するには、適用される凍結条件の許容範囲が限定されているので、供試する胚に対して最適な凍結条件を明らかにする必要があることを示している。

IV 摘要

ウシ体外受精胚を家兎卵管内または体外培養して発生した胚盤胞を用いて培養環境が耐凍性に及ぼす影響を検討した。

体外受精後の培養条件によって胚の品質が異なることが胚の凍結抵抗性に関係することが明らかにされた。また、体外受精由来胚盤胞でも家兎卵管内培養胚盤胞の耐凍性は通常の胚盤胞のそれと変わらない抵抗性を持つことが示された。しかし、現状で得られる体外受精・体外培養した胚盤胞は、凍結のための冷却時の機械的衝撃に対する抵抗性が低く、冷却脱水時に溶液効果の生じる温度が家兎卵管内培養胚盤胞より高いなど、膜の透過性に依存する脱水能や脱水後の塩濃縮などに対する物理化学的抵抗性も低いいため凍結条件は厳密に限定する必要があると思われた。

第3節 冷却速度および液体窒素浸漬温度がウシ体外受精・体外培養胚盤胞の生存性と受胎性におよぼす影響

これまでに報告された凍結融解後のウシ体外受精・体外培養に由来する胚盤胞の生存率は、高くても70%前後であった（梶原ら、1988;米谷ら、1989）。また、第2節で体外受精卵のうち家兎卵管内培養で作出した胚盤胞に比較して体外培養で作出した胚盤胞の耐凍性の低いことが示された。しかしながら、体外培養で作出した胚盤胞であっても凍結条件を限定すれば90%程度の高い生存性を得られることを明らかにした。このことは、凍結条件の検討により凍結融解後の生存性を改善できる可能性を示唆している。そこで、本節ではウシ体外受精・体外培養胚盤胞の凍結に最適な冷却速度とLN₂浸漬温度との関係を詳細に検討した。

I 材料および方法

第4章第2節に従って体外受精・体外培養胚を同様の方法で作出し、凍結融解後、培養検定を行った。

実験1：体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞の凍結に最適な冷却速度とLN₂への浸漬温度との関係では、体外成熟・体外受精・体外培養した胚盤胞を-2.5℃で植氷後、-5.2℃で10分間保持した。その後、0.3℃/分または0.7℃/分で-30℃、-33℃および-36℃まで、また、0.5℃/分で-21℃～-39℃まで冷却後、-160℃まで急冷した。その後、直ちにLN₂中に投入して、そのまま数時間から数日間保存した。

実験2：体外受精・体外培養胚盤胞を冷却して、冷却途中から加温して胚の生存性を調べた。実験1のプログラム（0.3℃/分）で冷却し、その後、-30℃から-45℃の間の3℃毎の各到達温度域から、37℃の温湯中に浸漬して直ちに融解した。

実験3：Bilton変法の0.3℃/分で-36℃まで冷却した区を対照区として実験1で融解

後の生存率の高かった3区の胚を融解後受胚牛に移植した。胚を37℃の温湯中に投入して15秒で融解後、6段階でglycerolを除去し、1%新生子牛血清を加えたM-199培地で数回洗浄してストローに再封入した。スタンディング発情7日目の受胚牛へ1人の術者が非外科的に2個の胚を両子宮角へ移植した。妊娠鑑定は、発情の30～40日に超音波診断装置を用いて行った。

凍結融解後の生存率と発生率の有意差検定および移植後の受胎率は、 χ^2 検定を行った。

II 結果

実験1：体外成熟・体外受精・体外培養胚盤胞の最適な冷却速度とLN₂への浸漬温度との関係

体外培養胚盤胞の凍結・融解後の生存性に及ぼす冷却速度とLN₂浸漬温度の影響を検討した。Table 4-1に示すように、最も高い生存率と発生率が得られた冷却速度とLN₂浸漬温度の組合せは、0.3℃/分では-30℃（86.1%、47.2%）0.5℃/分では-33℃～-36℃（86.8%、41.2%：84.4%、41%）、0.7℃/分では-36℃（72.1%、37.2%）であった。冷却速度が速くなるにつれて、最適なLN₂浸漬温度も低くなった。

実験2：体外受精・体外培養胚盤胞の脱水能の検定

0.3℃/分の冷却速度での体外受精・体外培養胚盤胞の生存性に関係する要因の1つとして冷却時の脱水能に着目し、生存性への影響を検討した。Table 4-2に示すように生存率は、各区間に有意差は認められなかったが、発生率は1番低い冷却温度の-45℃区で有意に低下した（ $P<0.05$ ）。

実験3：体外受精・体外培養胚の凍結融解後の受胎性

Table 4-3に示すように、Bilton(1980)の変法の0.3℃/分で-36℃まで冷却後凍結した対照区に比較して、実験1で高い生存率を示した3区の受胎率が有意差は認められないものの43.8～64.3%と高かった(Fig. 4-2)。

Table 4-1. Effects of cooling rate and plunging temperature on the post-thawing survival of bovine embryos matured, fertilized and developed in vitro

Cooling rate (°C/min.)	Plunging tempera- ture(°C)	No.(%) of embryos		
		Examined	Survived*	Developed**
0.3	-30	36	31(86.1) ^{a b}	17(54.8) ^a
	-33	62	30(48.4) ^a	11(36.7) ^{a b}
	-36	52	33(63.5) ^{d e}	12(36.4) ^{a b}
0.5	-21	68	40(58.8) ^a	10(25.0) ^b
	-24	63	39(61.9) ^a	9(23.1) ^b
	-27	76	63(82.9) ^{a b}	21(33.3) ^{a b}
	-30	53	43(81.1) ^{a b c}	15(34.9) ^{a b}
	-33	68	59(86.8) ^a	28(47.5) ^a
	-36	122	103(84.4) ^{a b}	50(48.5) ^a
	-39	61	55(90.2) ^a	20(36.4) ^{a b}
0.7	-30	42	34(81.0) ^{a b c d}	7(20.6) ^b
	-33	42	28(66.7) ^{c d e}	9(32.1) ^{a b}
	-36	43	31(72.1) ^{b c d e}	16(51.6) ^a

a,b,c,d,e: The different superscripts are significantly different in same column(P<0.05).

* : Rate of embryos examined.

** : Rate of embryos survived.

Table 4-2. Effect of dehydration temperature during cooling process on the viability of bovine embryos matured, fertilized and developed in vitro

Dehydration tempera- ture(°C)	No.(%) of embryos		
	Examined	Survival*	Developed**
-30	30	25(83.3) ^a	18(72.0) ^a
-33	38	37(97.4) ^a	20(54.1) ^{a,b}
-36	28	23(82.1) ^a	17(73.9) ^a
-39	47	43(91.5) ^a	26(60.5) ^a
-42	42	38(90.5) ^a	25(65.8) ^a
-45	53	44(83.0) ^a	18(40.9) ^b

a,b:The different superscripts are significantly different in same column(P<0.05).

*: Rate of embryos examined.

** : Rate of embryos survived.

Cooling rate is 0.3°C/minute.

Table 4-3. Viability of transferred bovine blastocysts
matured fertilized and developed in vitro

Cooling rate (°C/min.)	Plunging tempera- ture(°C)	No. of cows transferred	No.(%) of pregnant cows
0.3	-36	15	4 (26.7)
0.3	-30	14	9 (64.3)
0.5	-33	16	9 (56.3)
0.5	-36	16	7 (43.8)

Fig. 4-2. Morphological changes of frozen-thawed bovine embryos during stepwise glycerol removal and culture in vitro.

A: Cooling rate was 0.3°C/min. and plunging temperature was -36°C.

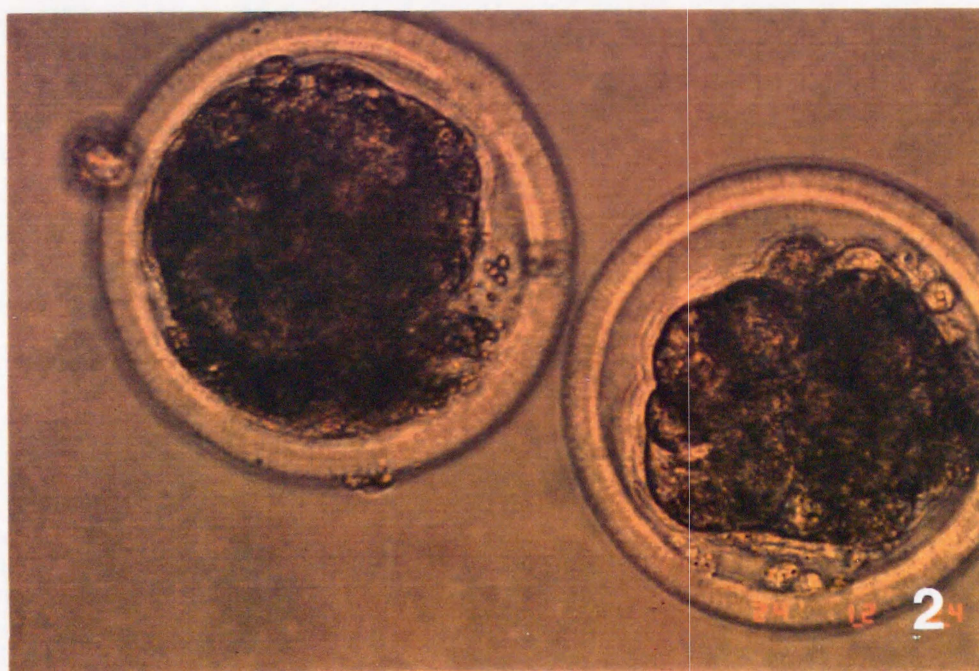
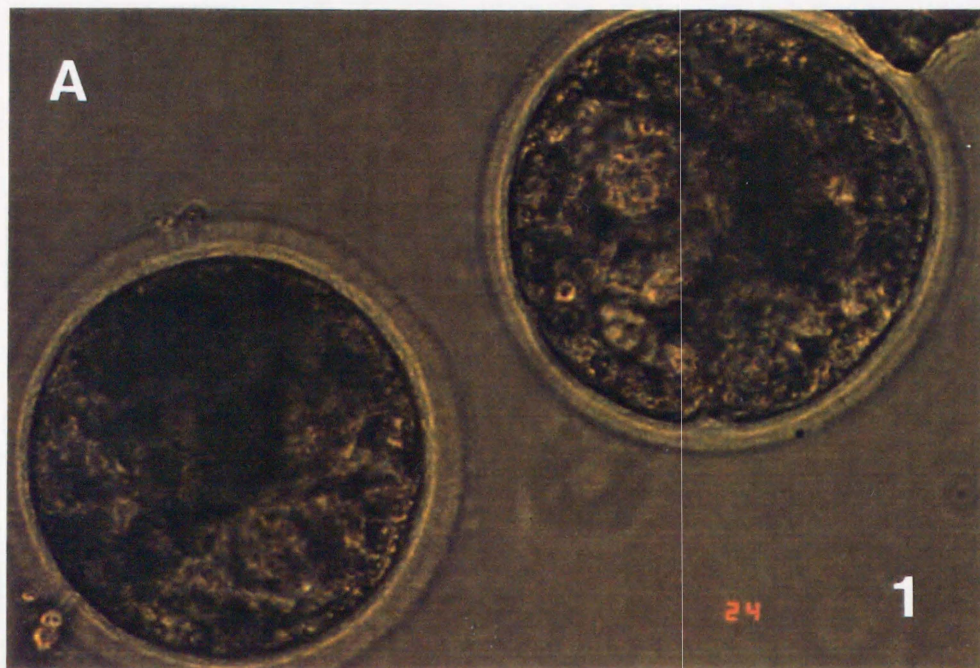
B: Cooling rate was 0.3°C/min. and plunging temperature was -30°C.

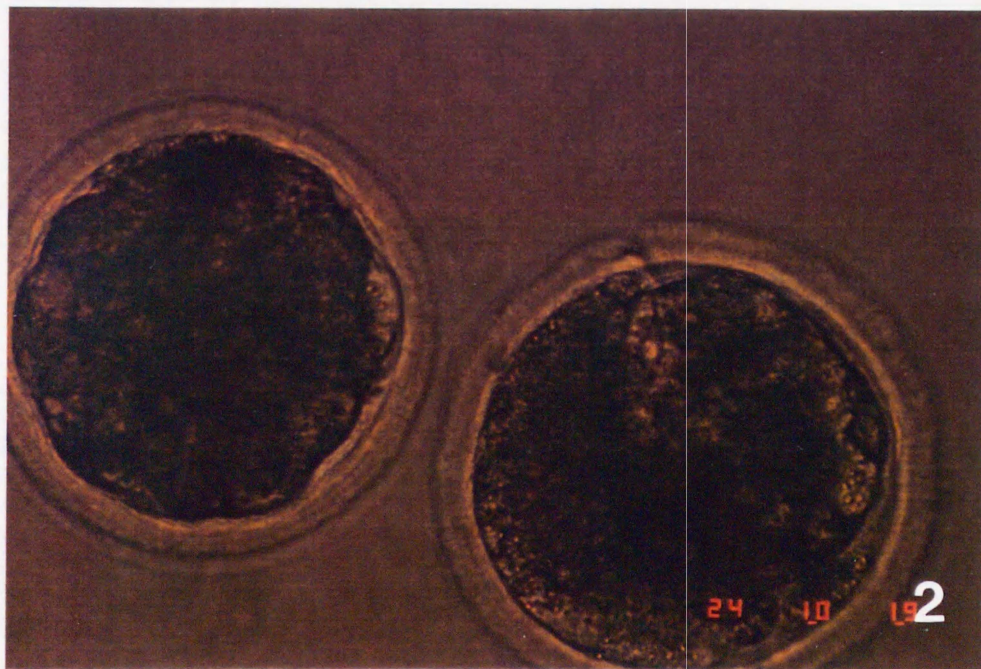
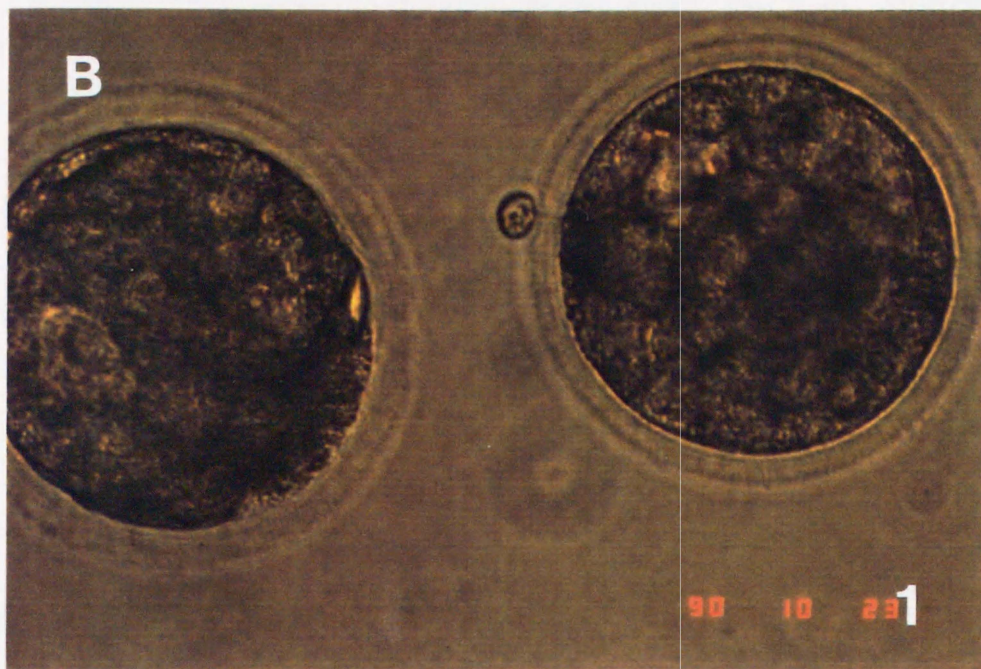
C: Cooling rate was 0.5°C/min. and plunging temperature was -33°C.

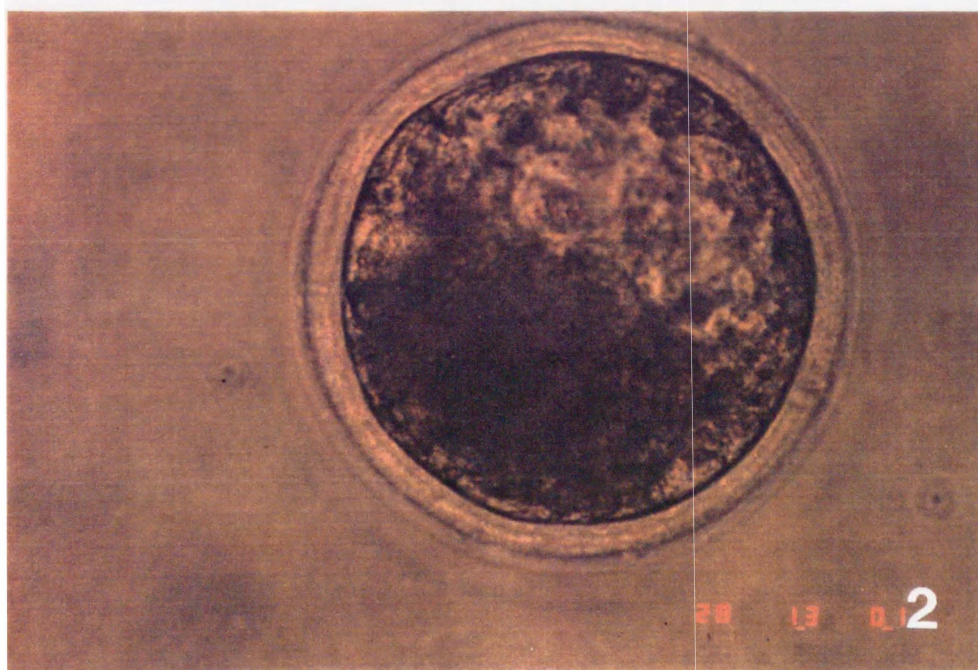
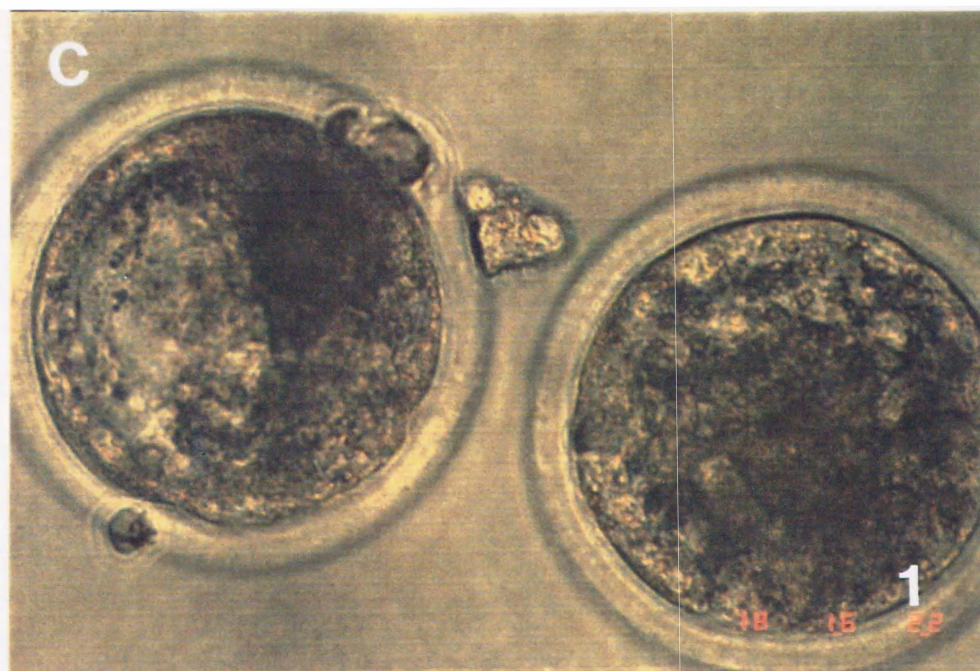
D: Cooling rate was 0.5°C/min. and plunging temperature was -36°C.

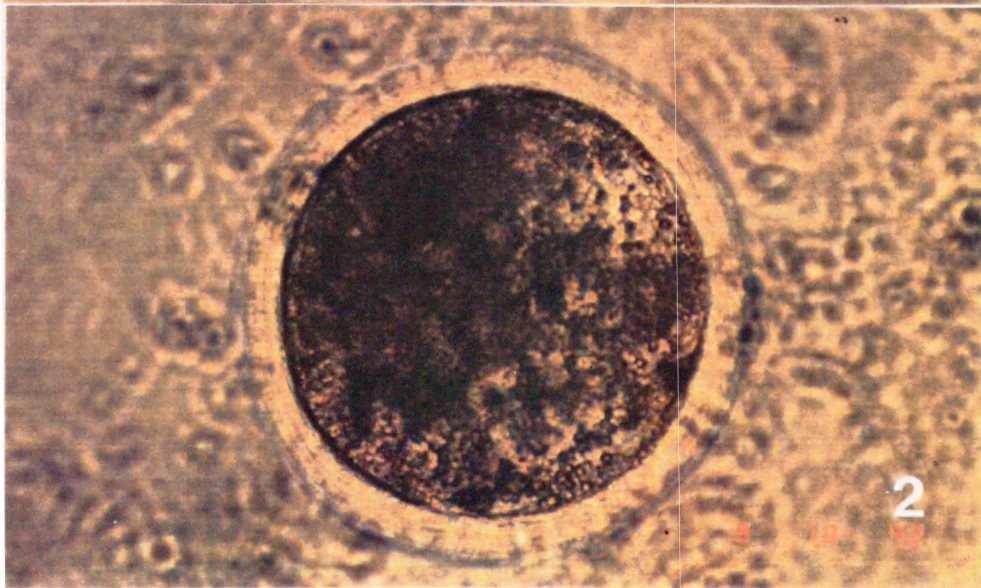
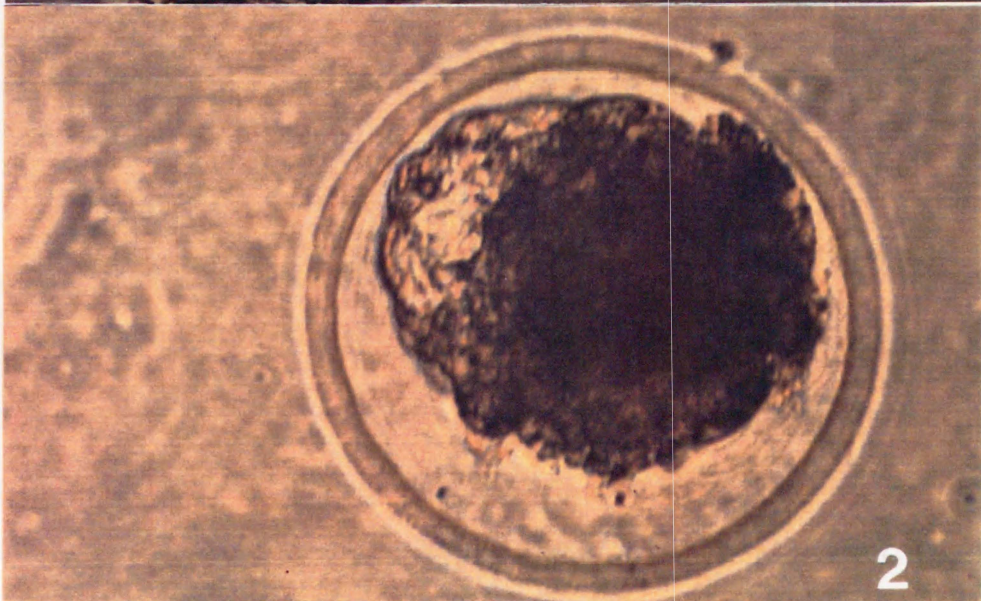
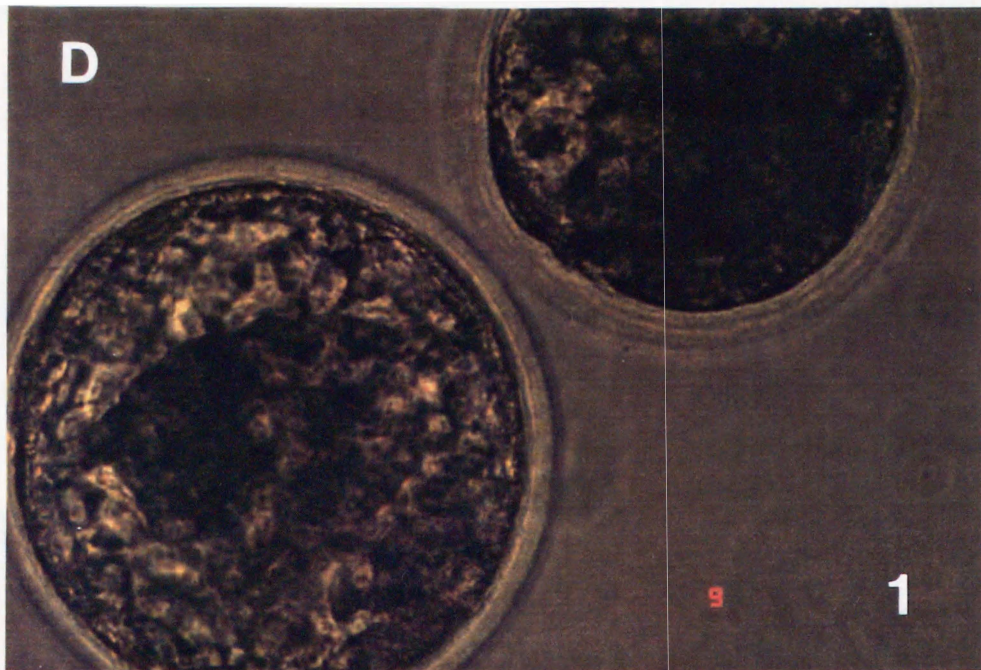
1. An embryo in 10% glycerol solution before freezing.

2. Frozen thawed embryo 2 hours after culture in TCM-199 medium.









Ⅲ 考察

第2節で体外受精・体外培養胚盤胞の耐凍性が低かったので、急速融解を前提として最適な冷却速度とLN₂浸漬温度との関係を詳細に検討した(実験1)。0.3℃/分で冷却した場合には-30℃からのLN₂への浸漬で高い生存性が得られ、-33℃より低い温度からのLN₂への浸漬では生存性は低下した。0.3℃より速い速度で冷却した場合には-33℃~-36℃(0.5℃/分)、-36℃(0.7℃/分)からのLN₂への浸漬で高い生存性が得られ、冷却速度が速くなるにつれより低い温度からのLN₂への浸漬で生存性が高まった。Mazur(1977)は、胚の凍結傷害を最適な凍結速度より速い場合と遅い場合に、細胞内凍結をおこさない脱水状態および脱水後の塩濃縮などによっておこされる蛋白変性などの溶液効果の二つの要因から説明している。その視点から考えると、本研究で得られた結果は次のように解釈される。0.3℃/分の遅い冷却速度では低い冷却温度に達するまでに脱水が充分に行われて、-30℃に達した時点で細胞内凍結を起こさない程度まで細胞内自由水の脱水が完了している。そのために-30℃でLN₂に浸漬した場合、高い生存性が得られる。しかし、-33℃および-36℃まで冷却すると過度に脱水され、溶液効果によって胚の生存性が低下する。0.5℃/分のより速い冷却速度では、細胞内凍結を起こさない程度まで脱水が完了するのは-33~-36℃で、この時点でLN₂中へ浸漬した場合には高い生存性を得ることができる。0.7℃のさらに速い冷却速度では、細胞内凍結を起こさない程度まで脱水するには少なくとも-36℃かそれよりも低い温度からLN₂へ浸漬した場合に高い生存性が得られると考えられる。

内海と湯原(1974)はラット胚を用いた凍結実験で、脱水後の胚は氷晶形成温度域を急速に冷却することによって胚細胞内氷晶形成を回避できることを明らかにしている。本実験での1.4M glycerolを耐凍剤とした場合の共晶点は-40℃前後と推定され、この前後に細胞内氷晶形成が始まると考えられる。ウシ体外受精・体外培養胚盤胞においてこの温度までに脱水を完了しておくには、0.3℃/分で冷却する場合、-30℃でLN₂へ浸漬する

までの83分、0.5℃/分で冷却する場合、-33℃~-36℃でLN₂浸漬するまでの56~62分、徐々に冷却する必要のあることが明らかにされた。ウシ体外受精・体外培養胚盤胞の凍結保存においては、凍結傷害である細胞内凍結と溶液効果を避け高い生存性を得るために、細胞内自由水が脱水された時点で時間をおくことなくLN₂へ浸漬することが重要な条件であることが明らかにされた。さらに、実験3では、Bilton(1980)変法として通常の供胚牛から採卵する胚盤胞での凍結に用いる凍結曲線で凍結した対照区と実験1で高い生存率を示した3区の計4区で凍結した胚盤胞の融解後の受胎性を検討した。この結果は、培養による生存率の結果をよく反映していた。これらの結果は0.3℃/分で-30℃まで冷却後LN₂へ浸漬して凍結した体外受精・体外培養胚盤胞を融解後3頭に移植して、2頭の受胎例を得たFukuda et al.(1990)の結果ともよく一致した。

本研究で得られたウシ体外受精・体外培養胚盤胞の凍結融解後の生存率は、極めて高いものであった。従来方法は、融解後の直接移植を目的にMassip and Zwalmen(1984)の方法に準じ、10% glycerolと0.2~0.25Mのショ糖を混合した凍結媒液で凍結している。それに準じて実施されたウシ体外受精・体外培養胚盤胞の凍結・融解後の生存率は70%前後であった(梶原ら、1988b;米谷ら、1989)。今回の結果からも明らかなように、体外受精・体外培養して得られた胚盤胞の冷却脱水後の溶液効果に対する抵抗性は供胚牛から回収された胚盤胞より低いため、glycerolとシュクロースを混合した浸透圧の高い凍結媒液を用いた場合に、生存性が低下したものと考えられる。

冷却速度を0.3℃/分にした場合、LN₂浸漬温度が-33℃以下では、胚の生存性が有意に低下して、過度の脱水によってもたらされる細胞内の塩類濃度が上昇する溶液効果によると考えられる凍結傷害が認められた。同様に0.3℃/分で冷却した場合に、冷却到達温度域を調べた実験では生存率の有意な低下は認められなかったが、発生率の低下は-45℃で認められた。体外受精・体外培養胚盤胞を0.3℃/分で冷却しLN₂へ浸漬した場合に溶液効果による凍結傷害は、-33℃以下への冷却により生じることが示されているが、過度の脱水による細胞内成分の変化は-42℃を越えるとおこり、両者の間には温度差が認めら

れた。このことは、体外培養胚盤胞は脱水が完了した状態で長く放置しておく、溶液効果によると考えられる傷害が顕著になり、胚の発生率を低下させることが示唆された。またこのような結果は、特に体外培養胚盤胞は脱水到達域まで冷却された時には速やかにLN₂へ浸漬した方が好結果が得られ、体外培養胚盤胞が溶液効果などに対する凍結抵抗性に対する許容範囲の狭いことをよく説明していた。

高い生存率が得られた冷却速度とLN₂浸漬温度の組合せの0.3℃/分と-30℃、0.5℃/分と-33℃または-36℃の3区と、0.3℃/分で-36℃まで冷却する対照区との計4区で受胚牛へ移植後の受胎率を比較した。対照区に比較して3区の試験区での受胎率が改善された。このことは、実験1の培養試験の結果から示される胚の生存性は、受胎能力を含めた胚の生存性の指標として利用できるものと考えられた。また、3区の合計の受胎率は、54.3%（46頭中25頭受胎）と供胚牛から回収された胚に比べて遜色の無い受胎率であった。

IV 摘要

体外受精後の培養胚の生存性に及ぼす冷却速度および液体窒素中への浸漬温度の影響について検討した。体外培養胚盤胞は、冷却速度を0.3℃/分とすると-30℃（LN₂浸漬温度；以下同じ）区が-33℃区と-36℃区に比較して生存率が高かったが、0.7℃/分では逆に-36℃区が他区に比べて高かった。0.5℃/分では-33℃と-36℃区が他区に比較して高かった。

脱水の限界を検討するために0.3℃/分で冷却して各温度から加温した場合に、-45℃以下になると発生率は有意に低下した。これは、過度の脱水による傷害（溶液効果）と考えられた。

以上から、現状で得られる体外受精・体外培養胚盤胞は、凍結のための冷却時の機械的衝撃に対する抵抗性が低く、膜の透過性に依存する脱水能や脱水後の塩濃縮などに対する物理化学的抵抗性も低いため凍結条件は厳密に限定する必要があると思われた。

高い生存率が得られた3種類の凍結曲線と、供胚牛から回収された胚を凍結する場合に通常用いている0.3℃/分で-36℃まで冷却する凍結曲線（対照区）との計4区で凍結・融解した胚盤胞の移植後の受胎率を比較した。対照区に比較して試験区での受胎率が改善されたことから、培養試験の結果から示される胚の生存性は、受胎能力を含めた胚の生存性の指標として利用できるものと考えられた。また、3区の合計の受胎率は、54.3%（46頭中25頭受胎）と供胚牛から回収された胚と遜色の無い受胎率であった。

第4節 凍結・融解したウシ体外受精・体外培養胚盤胞のストロー内glycerol除去の検討

第3節までにウシ体外受精・体外培養胚盤胞が適切な凍結条件で凍結・融解した場合には、高い生存率が得られ、受胎牛に移植した場合にも供胚牛から回収した胚と同程度の高い受胎率の得られることが明らかとなった。

一方、ウシ体外受精胚の野外での移植を普及するには凍結・融解した胚をストロー内から取り出すことなく移植する事が必要となる。これまでに、供胚牛から回収された胚を用いて、シュークロースを利用した胚のストロー内glycerol除去法が報告されている(Leibo;1983, 1984, 1985, 1986, Renard;1983, 富永ら;1986)。その中で、富永ら(1986)は、ストロー内にglycerolを含む凍結媒液、0.6MシュークロースとBMOC-3(Brinster;1971)を封入する方法を開発し、50%の受胎率を得たと報告している。この方法は、3種類の液を2段階で混合するため、Leibo(1983, 1984, 1985, 1986)のストロー内で1段階除去する方法やMassip and Zwalman(1984)や大谷ら(1989)の融解後直接移植する方法に比べて操作が煩雑であると考えられるが、最終的に培養液(BMOC-3)で除去するためストロー内での胚の生存性が高い。一方、桑山と浜野(1991)は体外受精由来胚盤胞を凍結融解後、1段階glycerol除去して直接移植し、55.8%と高い受胎率を得ている。

そこで、前節までに検討した最適凍結条件で、体外受精・体外培養胚を凍結し、融解後に野外でのglycerol除去と移植操作が無菌的に行えるストロー内glycerol除去(富永ら;1986)を行い、融解胚の生存性および移植後の受胎性を検討した。

I 材料および方法

1 胚盤胞の作出

第4章、第2節の方法に準じて作出した体外成熟・体外受精・体外培養由来胚盤胞を

凍結試験に供試した。

2 胚盤胞の凍結

凍結基礎媒液には33%新生子牛血清添加Ringer氏液、凍結保護物質には1.4M glycerolを用いた。

ストロー内glycerol除去法は、富永ら(1986)が報告した方法を用いた。Fig. 4-3のよう
に1.4M glycerolを含む凍結媒液、0.6Mシュクロース・新生子牛血清・リンゲル氏液
およびBMOC-3(Brinster; 1971)を1:2:9の割合で封入した。

胚の凍結は、液層式のプログラムフリーザー (EYELA:MPF-40型) を用いて、-4.7℃で
植氷した後、-35℃まで0.5℃/分で冷却した。冷却の完了した胚をLN₂ガスで間接的に急
冷した後にLN₂中に浸漬した。

3 凍結胚の融解、生存および発生検定と融解胚の受胚牛への移植

胚の融解を37℃の温湯中で行い、融解後、胚の含まれるglycerol層とシュクロ
ース層を混和し、37℃の温湯中で5分間静置した。次に、BMOC-3層と混和し、さらに5分間
静置してglycerol除去を行った。glycerolをストロー内除去した後、ストローからシャ
ーレへ取り出し、シャーレ内で数回洗浄した。一部を第2節と同様の方法で培養し、48
時間後に形態的に凍結前の状態に回復した胚を生存胚、脱出胚盤胞に発生した胚を脱出
胚盤胞として記録した。また、残りの胚を第3節の実験3と同様に0.25mlストローに封
入して、発情7日目の受胚牛に移植した。また、ストロー内でglycerol除去後にストロー
内から胚盤胞を取り出さずに直接移植を行う区を設定した。

II 結果

ストロー内でglycerol除去した胚の培養後の生存胚率はTable 4-4に示すように93.3%

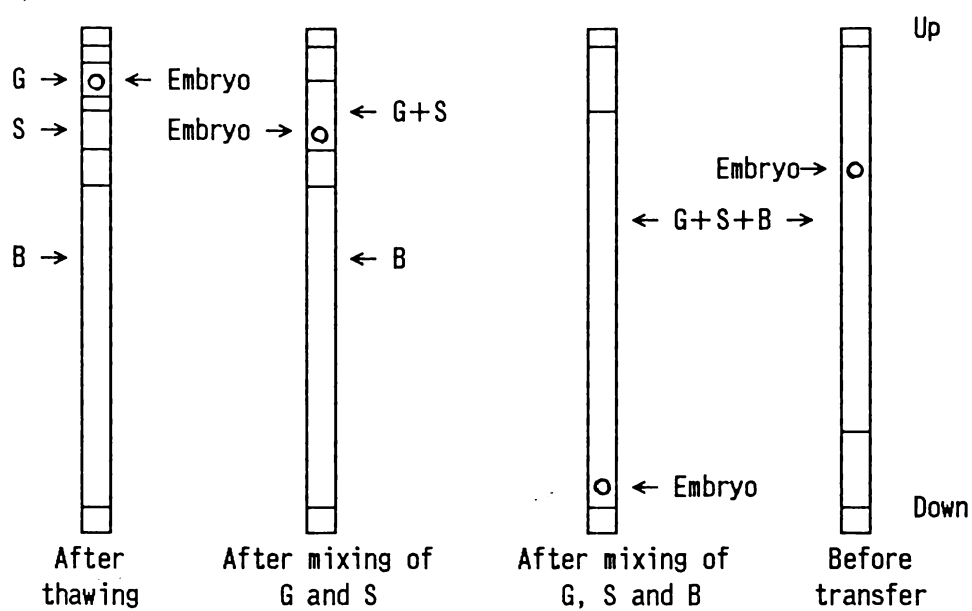


Fig. 4-3. Schematic drawing of glycerol dilution carried out within the straw.

G : freezing medium, S : 0.6M sucrose solution, B : BMOC-3 medium.

Table 4-4. Different methods of glycerol removal and viability of frozen-thawed bovine blastocysts matured, fertilized and developed in vitro

Methods of glycerol removal	No. of embryos examined	No.(%) of embryos	
		Survived*	Developed**
Stepwise	122	103 (84.4)	50 (48.5)
Two step	15	14 (93.3)	9 (64.3)

*: Rate of embryos examined.

** : Rate of embryos survived.

と6段階除去区の84.4%と共に高い値を示し、両者間に有意差は認められなかった。

次に、ストロー外で6段階除去後、培地で洗浄して同期化した受胚牛へ移植した区、ストロー内でglycerol除去後、ストローから取り出し胚の形態を確認し(Fig. 4-4)、培地で洗浄後同期化した受胚牛へ移植した区およびストロー内から取り出すことなく直接同期化した受胚牛へ移植した3区の受胎率は、Table 4-5に示すように各区とも50%以上であり、各区間に有意差はなかった。

Ⅲ 考察

ストロー内でglycerol除去した場合の胚の生存性と受胎性を検討した富永ら(1986)は、供胚牛から採卵した胚盤胞を用いて、凍結胚をストロー内glycerol除去と6段階除去で処理した後の培養試験で両者間に差の無いことを報告しているが、体外受精・体外培養由来の胚盤胞を用いた今回の結果でも両者間に有意な差は無かった。これは、体外受精・体外培養胚盤胞であっても、90%近い生存率の得られる凍結方法で凍結すれば胚の凍結傷害は極めて低く、供胚牛から採卵された胚盤胞と同程度の結果が得られることを示唆したものといえる。

ストロー内でglycerolを除去し、シャーレ内に戻して新鮮な培地で洗浄した後に移植した場合の受胎率がストロー内でglycerolを除去し直接移植した場合に比較して受胎率が低い傾向が認められた。融解後、移植までに1～2時間、培地の入ったストロー内で経過しており、ストロー内に胚を封入しておいたことが有意差はないものの受胎率の若干の低下につながったと考えられた。今回の、直接移植区での60.7%の受胎率は、富永ら(1986)の供胚牛から回収された胚盤胞での50%（6頭移植中3頭の受胎）という結果と同程度であり、体外受精・体外培養胚盤胞も本法で現地融解により移植に供せることが明らかとなった。

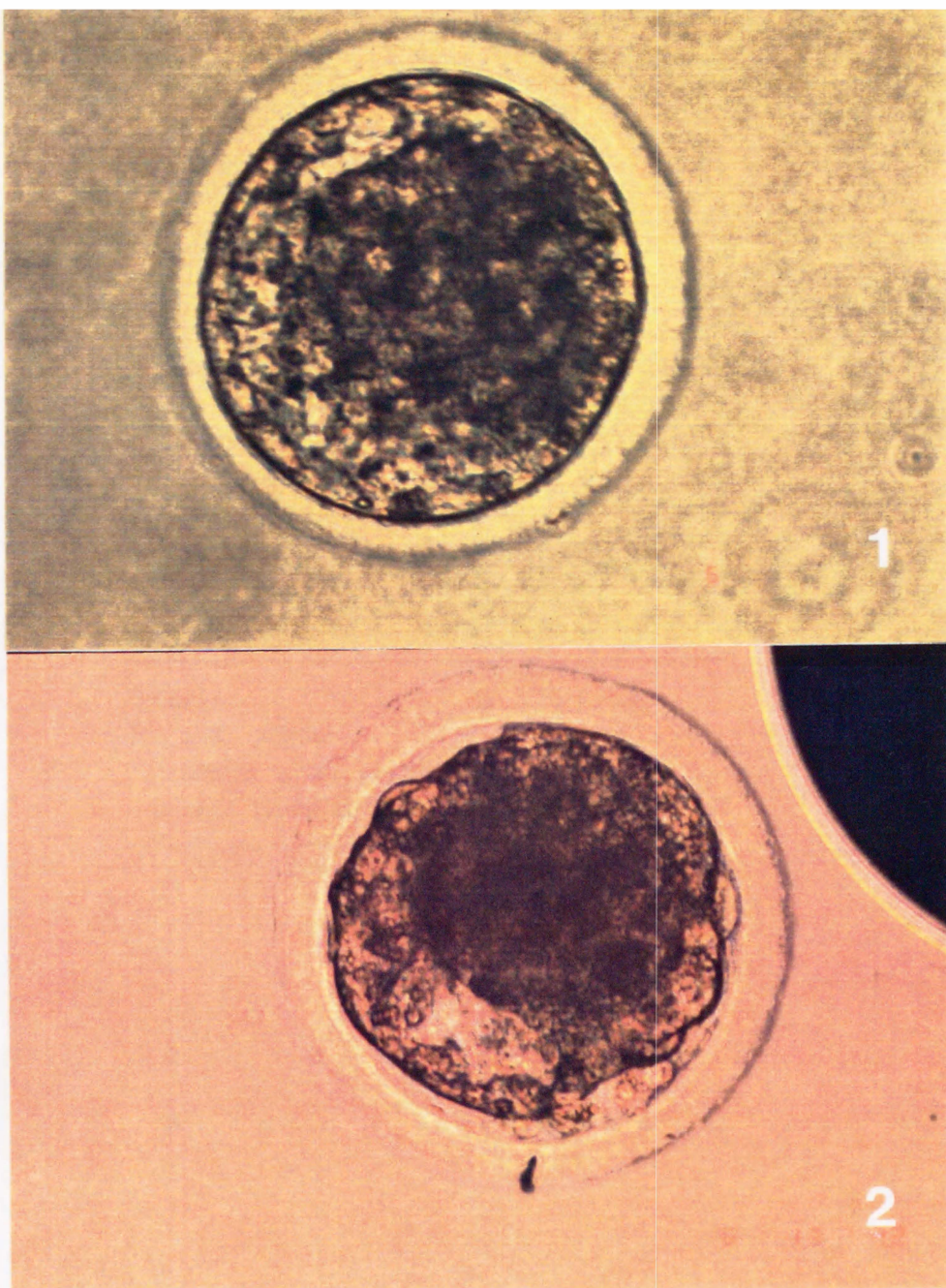


Fig. 4-4. Morphological changes of frozen-thawed bovine embryos during 2 step glycerol removal and culture in vitro.
Cooling rate was 0.5°C/min. and plunging temperature was -35°C.

1. An embryo in 10% glycerol solution before freezing.
2. Frozen thawed embryo 2 hours after culture in TCM-199 medium.

Table 4-5. Different methods of glycerol removal and pregnancy rate of frozen-thawed bovine blastocysts matured, fertilized and developed in vitro

Methods of glycerol removal	No.(%) of recipients	
	Transferred	Pregnant
Stepwise	46	25 (54.3)
Two step method		
Transfer after washing	16	8 (50.0)
Direct transfer	28	17 (60.7)

IV 摘要

野外での移植操作が無菌的に行えるストロー内glycerol除去を行うため、前節までに検討した最適凍結条件で、体外受精・体外培養胚を凍結し、融解後の生存性および移植後の受胎性を検討した。最適条件で凍結した胚はストロー内glycerol除去によっても、6段階glycerol除去と同等の高い生存率が得られた。6段階glycerol除去、ストロー内glycerol除去後、胚の形態を確認して移植あるいはストロー内glycerol除去後の直接移植の何れの方法によっても50%以上の受胎率の得られることが明らかとなり、体外受精・体外培養胚盤胞も本法で現地融解により移植に供せることが明らかとなった。

第5節 小括

ウシ体外受精・体外培養法で得られた胚盤胞の特性を明らかにして、凍結方法を確立させるために、第4章では体外受精後、体外培養で得られたウシ胚盤胞の凍結保存のための基礎的検討と凍結融解胚のストロー内glycerol除去を行った。

第2節では、ウシ体外受精胚を家兎卵管内または体外培養して発生した胚盤胞を用いて培養環境が耐凍性に及ぼす影響を検討した。体外受精後の培養条件によって胚の品質が異なることが胚の耐凍性に関係することが明らかにされた。また、体外受精胚盤胞でも家兎卵管内培養胚盤胞の耐凍性は通常の胚盤胞のそれと変わらない抵抗性を持つことが示された。しかし、現状で得られる体外受精・体外培養した胚盤胞は、凍結のための冷却時の機械的衝撃に対する抵抗性が低く、冷却脱水時に溶液効果の生じる温度が家兎卵管内培養胚盤胞より高いなど、膜の透過性に依存する脱水能や脱水後の塩濃縮などに対する物理化学的抵抗性も低いため凍結条件は厳密に限定する必要があると思われた。

第3節では、体外受精後の培養胚の生存性に及ぼす冷却速度およびLN₂中への浸漬温度の影響について検討した。体外培養胚盤胞は、冷却速度を0.3℃/分とすると-30℃(LN₂浸漬温度;以下同じ)区が-33℃区と-36℃区に比較して生存率が高かったが、0.7℃/分では逆に-36℃区が他区に比べて高かった。0.5℃/分では-33℃と-36℃区が他区に比較して高かった。

脱水の限界を検討するために0.3℃/分で冷却して各温度から加温した場合に、過度の脱水による傷害(溶液効果)は-45℃以下になると発生率は有意に低下した。

以上から、現状で得られる体外受精・体外培養胚盤胞は、凍結のための冷却時の機械的衝撃に対する抵抗性が低く、膜の透過性に依存する脱水能や脱水後の塩濃縮などに対する物理化学的抵抗性も低いため凍結条件は厳密に限定する必要があると思われた。

高い生存率が得られた3種類の凍結曲線と、供胚牛から回収された胚を凍結する場合に通常用いている0.3℃/分で-36℃まで冷却する凍結曲線(対照区)との計4区で凍結・融

解した胚の移植後の受胎率を比較した。対照区に比較して試験区での受胎率が改善されたことから、培養試験の結果から示される胚の生存性は、受胎能力を含めた胚の生存性の指標として利用できるものと考えられた。また、3区の合計の受胎率は、54.3%（46頭中25頭受胎）と供胚牛から回収された胚と遜色の無い受胎率であった。

第4節では、野外での移植操作が無菌的に行えるストロー内glycerol除去に応用するため、これまでに検討した最適凍結条件で、体外受精・体外培養胚を凍結し、融解後の生存性および移植後の受胎性を検討した。最適条件で凍結した胚はストロー内glycerol除去によっても6段階glycerol除去と同等の高い生存率が得られた。移植前に実験室で6段階glycerol除去およびストロー内glycerol除去を行い、胚の形態を確認して移植した場合と、野外でストロー内glycerol除去後にストロー内から胚を取り出すことなく直接移植する、何れの方法によっても50%以上の受胎率の得られることが示され、本法で現地融解により移植に供せることが明らかとなった。

第5章 総 括

本研究は、ウシ卵母細胞を用いた体外受精・体外培養法と体外受精由来胚盤胞の凍結保存法を確立し、さらにウシ卵母細胞の成熟、受精、胚発生および体外受精由来胚盤胞の耐凍性のメカニズムを解明することを目的として卵母細胞の成熟、受精および発生に及ぼす要因と体外受精由来胚盤胞の凍結・融解後の生存性に及ぼす要因を検討したものである。得られた結果の概要を以下に示した。

I ウシ卵母細胞の体外成熟に影響する培養環境条件の検討

1 ウシ卵母細胞の成熟培地へのゴナドトロピンとestradiol-17 β (E₂)の添加が成熟と その後の胚発生に及ぼす影響

ウシ卵母細胞の体外成熟培地へのFSH、LHやE₂の添加が体外受精後の胚発生能に及ぼす影響を検討した。受精率は88.2～90.9%で各区間に有意差は認められなかった(P<0.05)。4細胞期以上に分割した胚の割合は、無添加区と10 μ g/ml LH、1 μ g/ml E₂と2 μ g/ml FSHを含む区間で有意差が認められた他は、各区間で差が認められなかった。しかし、有意差の原因は明かではなかった。胚盤胞への発生率は、各区間で有意差が認められなかった。また、胚盤胞期胚の1部を8頭の受胎牛に移植したところ、ホルモン無添加区でも出産例が得られた。

以上のように卵丘細胞を含む顆粒膜細胞と同時に培養する実験系ではウシ卵母細胞の体外成熟培地へのゴナドトロピン、E₂の添加は、体外受精後の発生能に対して効果は認められなかった。

2 培養温度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響

ウシ卵母細胞の受精率に及ぼす培養温度の影響を検討した。種雄牛個体によって傾向

は異なるものの、体外成熟、体外受精環境としては、39℃が37℃より良好であった。成熟と精子前培養および授精時を含む授精以後に分離して培養温度の影響を検討したところ、受精率は授精時と授精以後を39℃とした場合に高かった。胚盤胞発生率は、受精率の低かった成熟時を37℃とした場合に授精以後を39℃しても発生率を改善できなかった。また、授精以後を37℃とすると胚盤胞の出現が39℃とした場合よりも1日遅れ、胚盤胞率も低かった。以上から成熟、精子前培養、授精とその後の培養温度は39℃にすべきであることが確認された。

3 酸素濃度がウシ卵母細胞の成熟とその後の胚発生に及ぼす影響

成熟培養時の酸素濃度がウシ卵母細胞の体外成熟率およびそれに続く体外受精率に及ぼす影響を検討した。気相中の実測酸素濃度10%前後を頂点として、酸素濃度の上昇と共に成熟率が低下した。特に、実測酸素濃度35%区が66.9%(109/163)と他区の78.6～83.3%に対して有意に低かった($P<0.05$)。単精子受精率も同様であった。受精後の胚発生率では実測酸素濃度13%区が酸素濃度20%区に比較して有意に高かった($P<0.05$)。

II ウシ体外受精における種雄牛個体による受精率の差異と精子前培養時のHeparinおよびCaffeineの体外受精とその後の胚発生に及ぼす影響

1 体外受精における受精率と胚発生率に及ぼす種雄牛個体差の影響

種雄牛ごとの体外受精率およびその後の胚発生能の差を比較検討した。体外受精の受精率は種雄牛による個体差があり、受精率の低い個体は4細胞期以上への胚発生率も低く、特に受精率が極端に低い(20%以下)個体の精子は体外受精には使用すべきではないと考えられた。さらに、計算上の受精卵の胚発生成績を検討したところ、全ての種雄牛において受精卵の4細胞期胚への発生率が同程度であった。このことは、受精以後の胚発生は種雄牛個体差による精子側の要因に影響されないことを示唆した。

2 ウシ精子前培養時のHeparin (Hep)およびCaffeine (Caf)の添加が体外受精とその後 の胚発生に及ぼす影響

精子の前培養処理は、受精時間の同期化には重要であり、2.5～5時間の前培養が必要であることが示された。CafまたはHepの添加によって受精率および授精の7～8日目の胚盤胞の発生率が有意に増加した($P<0.05$)。これは、両処理によって正常受精卵率（単精子受精卵率）が増加したことが反映されたものと考えられた。また、HepとCafを使用した場合の相乗効果は、みられなかった。

最終的（授精18時間）な受精率ではCaf処理区とHep処理区で差はないものの、受精初期の過程ではHep処理精子の侵入経過が早く、Cafに比較してHepが直接的に受精能獲得および先体反応に関与していることが明らかとなった。以上より、胚発生率を高めるためには、受精時に雌雄前核の同期化の行われることが重要であり、Hepを中心とした前培養処理によって胚発生率を改善できることが明らかとなった。

Ⅲ ウシ体外受精由来胚盤胞の凍結保存

1 体外受精後、体外および家兎卵管内で培養されたウシ胚盤胞の耐凍性の検討

ウシ体外受精胚を家兎卵管内または体外培養して発生した胚盤胞を用いて培養環境が胚の耐凍性に及ぼす影響を検討した。体外受精後の培養条件によって胚の品質が異なり、胚の耐凍性に関係することが明らかにされた。現状で得られる体外受精・体外培養した胚盤胞は、凍結のための冷却時の機械的衝撃に対する抵抗性が低く、冷却脱水時に溶液効果の生じる温度が家兎卵管内培養胚盤胞より高いなど、膜の透過性に依存する脱水能や脱水後の塩濃縮などに対する物理化学的抵抗性も低いため凍結条件は厳密に限定する必要があると思われた。

2 冷却速度および液体窒素浸漬温度がウシ体外受精・体外培養胚盤胞の生存性と受胎性に及ぼす影響

体外受精後の培養胚の生存性に及ぼす冷却速度および液体窒素中への浸漬温度の影響について検討した。体外培養胚盤胞は、冷却速度を $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ とすると -30°C (LN_2 浸漬温度;以下同じ) 区が -33°C 区と -36°C 区に比較して生存率が高かったが、 $0.7^{\circ}\text{C}/\text{分}$ では逆に -36°C 区が他区に比べて高かった。 $0.5^{\circ}\text{C}/\text{分}$ では -33°C と -36°C 区が他区に比較して高かった。脱水の限界を検討するために $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で冷却して各温度から加温した場合に、過度の脱水による傷害(溶液効果)は -45°C 以下になると発生率が、有意に低下した。

高い生存率が得られた3種類の凍結曲線と、供胚牛から回収された胚を凍結する場合に通常用いている $0.3^{\circ}\text{C}/\text{分}$ で -36°C まで冷却する凍結曲線(対照区)との計4区で凍結・融解した胚の移植後の受胎率を比較した。対照区に比較して試験区での受胎率が改善されたことから、培養試験の結果から示される胚の生存性は、受胎能力を含めた胚の生存性の指標として利用できるものと考えられた。また、3区の合計の受胎率は、54.3% (46頭中25頭受胎) と供胚牛から回収された胚と遜色の無い受胎率であった。

3 凍結・融解したウシ体外受精・体外培養胚盤胞のストロー内glycerol除去の検討

野外での移植操作が無菌的に行えるストロー内glycerol除去に応用するため、これまでに検討した最適凍結条件で、体外受精・体外培養胚を凍結し、融解後の生存性および移植後の受胎性を検討した。最適条件で凍結した胚はストロー内glycerol除去によっても6段階glycerol除去と同等の高い生存率が得られた。移植前に実験室で6段階glycerol除去およびストロー内glycerol除去を行い、胚の形態を確認して移植した場合と、野外でストロー内glycerol除去後にストロー内から胚を取り出すことなく直接移植する、何れの方法によっても50%以上の受胎率の得られることが示され、本法で現地融解により移植に供せることが明らかとなった。

本研究の結果、ウシ体外受精において胚発生率に関わる要因としては卵母細胞の成熟、精子の前培養処理と体外培養条件が考えられた。高い胚発生率を得るには、成熟条件を整理し、雄性核と雌性核との時期的な同期化が図れる精子前培養条件を用いて高い正常受精率の得られる実験系を設定することが重要と考えられた。また、高い胚発生率を得たとしても、胚の耐凍性では、受精後の培養条件が大きな要因と考えられ、今後、培養環境の解明および改善が必要と思われた。

謝 辞

本論文をまとめるにあたり格別の御指導と御校閲を賜りました京都大学農学部教授入谷 明博士に深甚なる謝意を表します。

本研究の遂行にあたり種々の御教示と御鞭撻を賜りました京都大学農学部助教授内海恭三博士に厚く御礼申し上げます。

ウシ体外受精技術の御教示を賜りました農林水産省畜産試験場繁殖部長花田 章博士、胎生発育研究室長塩谷康生博士ならびに主任研究官永井 卓博士、本研究の機会を与えていただいた元兵庫県立畜産試験場、場長故金藤襄輔氏はじめ旧第一研究部の各位に御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり適切な御助言をいただきました兵庫県立中央農業技術センター生物工学研究所主任研究員冨永敬一郎博士ならびに取りまとめにあたり御教示いただいた神戸大学名誉教授福島豊一博士に深謝します。

卵巣採取に御協力いただいた兵庫県食肉検査センターの検査員の方々に謝意を表します。

本論文をまとめる機会を与えていただいた兵庫県立中央農業技術センター生物工学研究所所長神納 淨博士ならびに第2研究室長秦谷 豊氏に感謝します。

引用文献

- Betteridge, K. J. (1977) In vitro fertilization and use of follicular oocytes. In Embryo transfer in farm animals, Canada Dept. Agriculture Press 16, pp9.
- Betterbed, B. and R.W.Wright, Jr.(1985) Development of one-cell ovine embryos in two culture media under two gas atmospheres. Theriogenology 23, 547-553.
- Bilton, R. J. (1980) Preservation of embryos of the large domestic species. Proc. 9th Int. Congr. Animal. Reprod. Artific. Insem.(Madrid), 245-252.
- Brackett, B. G. and G. Oliphant(1975)Capacitation of rabbit spermatozoa in vitro. Biol. Reprod., 12: 260-274.
- Brackett, B. G., D. Bousquet, M. L. Boice, W. J. Donawick, J. F. Evans and M. A. Dressel (1982) Normal development following in vitro fertilization in the cow. Biol. Reprod., 27:147-158.
- Brinster, R. L. (1971) In vitro culture of the embryo. In Pathways to Conception. Charles C. Thomas Publishing Company, Springfield, Illinois.
- Critser E. S., M. L. Leibfried-Rutledge, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First (1986) Acquisition of developmental competence during maturation in vitro. Theriogenology, 25:150.
- Davis, D. L. and B. N. Day(1978) Cleavage and blastocyst formation by pig eggs in vitro. J. Anim. Sci., 46:1043-1053.
- Dorfmann, A. D., S. Bender, P. Robinson, E. Fugger, M. Bustillo and J. D. Schulman (1987) Effects of reduced oxygen concentration on in vitro fertilization and cleavage of human oocytes. 43rd. Annual Meeting of the American Fertility Society, 46.
- Edwards, R. G. (1965) Maturation in vitro of mouse, sheep, cow, pig, rhesus monkey and human ovarian oocytes. Nature(London), 208:349-351.
- Eng, L. A., E. T. Kornegay, J. Huntington and T. Wellman(1986) Effects of incubation temperature and pig oocytes in vitro. J. Reprod. Fert., 76:657.
- Eppig, J. J. (1980) Role of serum in FSH stimulated cumulus expansion by mouse

oocyte-cumulus cell complexes in vitro. Biol. Reprod., 22:629-633.

Erickson, B. H.(1966)Development and senescence of the postnatal bovine ovary. J. Anim. Sci., 25:800-805.

Fraser, L. R. (1979) Accelerated mouse sperm penetration in vitro in the presence of caffeine. J. Reprod. Fert., 57:377-384.

Fraser, L. R. (1987) Minimum and maximum extracellular Ca^{2+} requirements during mouse sperm capacitation and fertilization in vitro. J. Reprod. Fert., 81:77-89.

Freshney, R. I.(1987)The culture environment: Substrate, gas phase, medium and temperature. In Culture of animal cells.(Freshney, R. I. ed.)Alan,R. Liss,Inc, New York: pp57-84.

Fukuda, Y, M. Ichikawa, K. Naito and Y. Toyoda(1990) Birth of normal calves resulting from bovine oocytes matured, fertilized, and cultured with cumulus cells in vitro up to the blastocyst stage. Biol. Reprod. 42:114-119.

Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono(1983) Fertilization and cleavage of bovine follicular oocytes in rabbit reproductive tracts after maturation in vitro. J. Exp. Zool.,226:137-142.

Fukui, Y., M. Fukushima and H. Ono (1985) In vitro maturation of bovine oocytes recovered from follicles of various sizes. Res. Bull. Obihiro Univ., 14:211-217.

Fukui, Y. and H. Ono(1989) Effects of sera, hormones and granulosa cells added to culture medium for in-vitro maturation, fertilization, cleavage and development of bovine oocytes. J. Reprod. Fertil., 86:501-506.

Fukui, Y. (1990) Effect of follicle cells on the acrosome reaction, fertilization and developmental competence of bovine oocytes matured in vitro. Mol. Reprod. Dev., 26:40-46.

Fukui, Y., T. Sonoyama, H. Mochizuki and H. Ono(1990)Effects of heparin dosage and sperm capacitation time on in vitro fertilization and cleavage of bovine oocytes matured in vitro. Theriogenology,34:579-591.

福島達哉、南橋昭、花田章、塩谷康生(1986)体外受精のための牛精子前培養法の種雄牛別検討、その2.日本畜産学会大会第78回講演要旨, 17.

福島護之、富永敬一郎、太田垣進、山下弘昭、藤原義昭(1986)牛精子の受胎性とハムスターテスト. 兵庫畜試研報, 23:60-64.

Gordon, I. and K. H. Lu (1990) Production of embryos in vitro and its impact on livestock production. *Theriogenology*, 33:77-87.

Goto, K., Y. Kajihara, S. Kosaka, M. Koba, Y. Nakanishi and K. Ogawa (1988) Pregnancies after co-culture of cumulus cells with bovine embryos derived from in-vitro fertilization of in-vitro matured follicular oocytes. *J.Reprod. Fert.* 83:753-758.

Haidri, A. A., I. M. Miller and R. B. L. Gwatkin(1971)Culture of mouse oocytes in vitro, using a system without oil or protein. *J. Reprod. Fert.*, 26:409-411.

Ham, R. G. and W. L. McKeethan (1981) Media and growth requirements. In *Cell culture*, (Jakoby, W.B. and I.H.Pastan, eds.) Academic press., London.pp44-93.

花田章、服部篤臣、塩谷康生(1985a)体外受精におけるウシ精子前処理法の種雄牛別検討. 昭和60年度秋季家畜繁殖学会講演要旨, 12.

花田章、塩谷康生、坂本恭一、小林仁(1985b)体外受精された牛体外成熟卵子の胚盤胞への発育. 第77回日本畜産学会大会講演要旨, 79.

花田章、塩谷康生、鈴木達行(1986)体外成熟卵子の体外受精により得られた牛胚の非外科的移植による受胎出産例. 第78回日本畜産学会大会講演要旨, 18.

花田章(1986)ウシにおける体外受精、とくにイオノホアによる精子の受精能獲得. 家畜繁殖誌, 31: 56P-61P.

Handrow, R. R., R. W. Lenz and R. L. Ax (1982) Structural comparisons among glycosaminoglycans to promote an acrosome reaction in bovine spermatozoa. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 107:1326-1332.

Hillery, F. L., J. J. Parrish and N. L. First (1990) Bull-specific effect on fertilization and embryo development in vitro. *Theriogenology*.33,249.

Hurst, R. E., R. L. Bynum, E. Einfeldt and Johnny (1988) The identification of

a heparin-binding protein on the surface of bovine sperm. Biochem. Biophys. Res. Commun., 153:289-293.

Hyttle, P., T. Greve, K. P. Xu and H. Callesen (1987) Ultrastructural aspects of bovine fertilization in vivo and in vitro. Application of egg and embryo technologies to domestic animals, Copenhagen, pp41-44.

Iritani, A. and K. Niwa(1977) Capacitation of bull spermatozoa and fertilization in vitro of cattle follicular oocytes matured in culture. J. Reprod. Fert., 50:119-121.

入谷 明(1981): 初期胚の生存環境研究法: 哺乳動物の初期発生, (妹尾左知丸, 加藤淑裕, 入谷 明, 鈴木秋悦, 館 鄰)理工学社, 東京. pp343-350.

Iritani, A., M. Kasai, K. Niwa and H. B. Song (1984) Fertilization in vitro of cattle follicular oocytes with ejaculated spermatozoa capacitated in a chemically defined medium. J. Reprod. Fert., 70:487-492.

Iritani, A., K. Utsumi, M. Miyake and Y. Yamaguchi(1986) Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa. Develop. Growth and Differ., Suppl.28,45.

Iwasaki, S., N. Yoshida, H. Ushijima, S. Watanabe and T. Nakahara (1990a) Morphology and proportion of inner cell mass of bovine blastocysts fertilized in vitro and in vivo. J. Reprod. Fert., 90:279-284.

Iwasaki, S., N. Yoshida, S. Watanabe and T. Nakahara(1990b) Differential nuclear staining and cell count of trophectoderm and inner cell mass of bovine blastocyst fertilized in vitro by double fluorochrome dye technique. Jpn. J. Anim. Reprod., 36: 60-65

Jones, H. P., R. W. Lenz, B. A. Palevitz and M. J. Cormier (1980) Calmodulin localization in mammalian spermatozoa. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:2772-2776.

梶原豊、後藤和文、小坂昭三、中西喜彦、小川清彦(1987)牛卵胞卵子の体外受精および体外培養によるふ化. 家畜繁殖誌, 33:173-180.

梶原豊、後藤和文、徳丸元幸、木庭正光、中西喜彦、小川清彦(1988a)牛卵胞卵子の体外成熟・体外受精および体外培養により得られた胚盤胞の割球数と染色体分析. 家畜繁殖誌, 34:191-198.

梶原豊、米谷尚子、小山恒太郎、小柴雄二、菱山和洋、小林里美、白石憲司、安積弥一郎(1988b)牛の体外受精由来胚の凍結保存(0ステップ移植法による凍結保存について). 第74回家畜繁殖学会講演要旨, 29.

桑山正成、浜野晴三(1991)ウシIVM-IVF由来胚盤胞の凍結保存、繁殖技術会誌、13:165-171.

米谷尚子、梶原豊、小林里美、下中裕次、斉藤聡、小柴雄二、菱山和洋、白石憲司(1989)牛体外受精由来胚の0ステップ移植法による凍結保存. 第82回日本畜産学会講演要旨. 115.

Lavy, G., M. P. Diamond, A. Pellicer, W. K. Vaughn and A. H. Decherney (1988) The effect of incubation temperature on the cleavage rate of mouse embryos in vitro. *J. Vitro. Fert. Emb. Trans.*, 5: 167.

Leclerc, P., M. A. Sirard, J. G. Chafouleas and R. D. Lambert (1990) Decreased binding of calmodulin to bull sperm proteins during heparin-induced capacitation. *Biol. Reprod.*, 42:483-489.

Lehn-Jensen, H. and T. Greve (1982) The survival of cow blastocysts frozen in 1.4M glycerol after plunging between -15 and -60°C and rapid thawing. *Theriogenology*, 17:95(Abstr).

Leibfried, M. L., E. S. Critser, W. H. Eyestone, D. L. Northey and N. L. First (1987) Development potential of bovine oocytes matured in vitro or in vivo. *Biol. Reprod.*, 36:376-383.

Leibo, S. P. (1983) Field trial of one-step frozen bovine embryos transferred non-surgically. *Theriogenology*, 19:139.

Leibo, S. P. (1984) One-step method for direct nonsurgical transfer of frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 21:767-790.

Leibo, S. P. (1985) Field trial of one-step diluted frozen-thawed bovine embryos: an update. *Theriogenology*, 23:201.

Leibo, S. P. (1986) Commercial production of pregnancies from one-step diluted frozen-thawed bovine embryos. *Theriogenology*, 25:166.

Lenz, R. W., G. D. Ball, M. L. Liebfried, R. L. Ax and N. L. First (1983) In vitro maturation and fertilization of bovine oocytes are temperature-dependent process. Biol. Reprod., 29:173-179.

Lu, K. H., I. Gordon, M. Gallagher and H. McGovern (1987) Pregnancy established in cattle by transfer of embryos derived from in vitro fertilisation of oocytes matured in vitro. Vet. Rec., 121:259-260.

Lu, K. H., I. Gordon, H. B. Chen, M. Gallagher and H. McGovern (1988) Birth of twins after transfer of cattle embryos produced by in vitro techniques. Vet. Rec., 122:539-540.

Massip, A. and P. Zwalmen (1984) Direct transfer of frozen cow embryos in glycerol-sucrose. Vet Rec, 115:327-328.

Mazur, P. (1977) Slow-freezing injury in mammalian cells. In: The Freezing of Mammalian Embryos, Ciba Foundation Symposium 52, Elsevier Excerpta Media, North-Holland. pp19-48.

Miller, D. J., M. A. Winer and R. L. Ax (1990) Heparin-binding proteines from seminal plasma bind to bovine spermatozoa and modulate capacitation by heparin. Biol. Reprod., 42:899-915.

Miller, K. F. and V. G. Pursel (1987) Absorption of compounds in medium by the oil covering microdrop cultures. Gamete. Res., 17:57-61.

湊芳明、塩谷康生、桑山正成、山崎由起子、南橋昭、永井卓、花田章(1986)ウシ体外成熟卵子の体外受精後の初期発生能力に及ぼす成熟培養時間および培地交換時間の影響。昭和61年度秋季家畜繁殖学会講演要旨, 16.

湊芳明 (1989) 牛の体外受精: 体外受精卵移植による受胎および分娩成績. 第82回日本畜産学会講演要旨, 78.

Moor, R. M. and A. O. Trounson (1977) Hormonal and follicular factors affecting maturation of sheep oocytes in vitro and their subsequent developmental capacity. J. Reprod. Fert., 49:101-109.

Nakao, H. and N. Nakatsuji (1990) Effects of coculture, medium components and gas phase on in vitro culture of in vitro matured and in vitro fertilized bovine embryos. Theriogenology, 33:591-600.

Newcomb, R., W. B. Christie and L. E. A. Rowson(1978) Birth of calves after in vivo fertilisation of oocytes removed from follicles and matured in vitro. Vet. Rec., 102:461-462.

Niwa, K. and O. Ohgoda(1988) Synergistic effect of caffeine and heparin on in-vitro fertilization of cattle oocytes matured in culture. Theriogenology, 30: 733-741.

Ohgoda, O., K. Niwa, M. Yuhara, S. Takahashi and K. Kanoya (1988) Variations in penetration rate in vitro of bovine follicular oocytes do not reflect conception rates after artificial insemination using frozen semen from different bulls. Theriogenology, 29:1375-1381.

小野寺政一、角田幸生(1988)単為発生卵と集合したマウス8および16分離胚の生存性に及ぼすPHAならびに培養気相条件の影響、家畜繁殖誌、34:1-7.

大谷健、向島幸司、内海恭三、入谷明(1989)無希釈移植のためのウシ胚凍結保存と移植法の開発、繁殖技術誌、11:14-19.

Park, C. -K., O. Ohgoda and K. Niwa (1989) Penetration of bovine follicular oocytes by frozen-thawed spermatozoa in the presence of caffeine and heparin. J. Reprod. Fert., 86:577-582.

Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish and N. L. First (1985) Effect of heparin and chondroitin sulfate on the acrosome reaction and fertility of bovine sperm in vitro. Theriogenology, 24:537-549.

Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. L. Leibfried, E. S. Critser, W. H. Eyestone and N. L. First (1986) Bovine in vitro fertilization with frozen-thawed semen. Theriogenology, 25:591-600.

Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish, M. A. Winer and N. L. First (1988) Capacitation of bovine sperm by heparin. Biol. Reprod., 38:1171-1180.

Parrish, J. J., J. L. Susko-Parrish and N. L. First (1989) Capacitation of bovine sperm by heparin: Inhibitory effect of glucose and role of intracellular pH. Biol. Reprod., 41:683-699.

Pellicer, A., A. Lightman and A. H. DeCherney (1989) The effect of prefreezing

in vitro culturing on the success of embryo freezing in mice. J. Vitro. Fert. Embryo Transfer, 6:176-179.

Pincus, G. and E. V. Enzmann (1935) The comparative behavior of mammalian eggs in vivo and in vitro. J. Exp. Med., 62:665-675.

Quinn, P. and G. M. Harlow (1978) The effect of oxygen on the development of preimplantation mouse embryos in vitro. J. Exp. Zool., 206:73-80.

Renard, J. P., Y. Heyman, P. Leymonie and J. C. Plat (1983) Sucrose dilution: A technique for field transfer of bovine embryos frozen in the straw. Theriogenology, 19:145.

Saeki, K., H. Kato, Y. Hosoi, M. Miyake, K. Utsumi and A. Iritani (1991) Early morphological events of in vitro fertilized bovine oocytes with frozen-thawed spermatozoa. Theriogenology, 35:1051-1058.

佐藤英明、入谷 明、西川義正(1977)ブタ及びウシ卵胞卵の体外培養、とくに卵の成熟に影響する要因について.家畜繁殖誌、23:12-18.

佐藤英明、入谷 明、西川義正(1978)ウシ卵胞卵の体外成熟および活性化現象について、日畜会報、49:236-242.

Schroeder, A. C. and J. J. Eppig (1984)The developmental capacity of mouse oocytes that matured spontaneously in vitro is normal. Devel. Biol., 102:493-497.

Shea, B. F., J. P. A. Latour, K. N. Bedirian and R. D. Baker (1976) Maturation in vitro and subsequent penetrability of bovine follicular oocytes. J. Anim. Sci., 43:809-815.

Shi, D. S., K. H. Lu and I. Gordon (1990) Effect of bulls on fertilization of bovine oocytes and their subsequent development in vitro. Theriogenology, 33: 324.

Shioya, Y., M. Kuwayama, M. Fukushima, S. Iwasaki and A. Hanada (1989)In vitro fertilization and cleavage capability of bovine follicular oocytes classified by cumulus cells and matured in vitro. Theriogenology, 30:489-496.

Sirard, M. A. and R. D. Lambert (1985) In vitro fertilization of bovine

follicular oocytes obtained by laparoscopy. Biol. Reprod., 33:487-494.

Sirard, M. A. and R. D. Lambert (1986) Birth of calves after in vitro fertilisation using laparoscopy and rabbit oviduct incubation of zygotes. Vet. Rec., 119:167-169.

Stubbings, R. B., K. J. Betteridge and P. K. Basrur (1988) Investigations of culture requirements for bovine oocyte maturation in vitro. Theriogenology, 29:313.

住吉健也、猪八重悟、内海恭三、湯原正高(1979)凍結精子の融解後の精子活力、酸素消費量と受胎性、人工授精研誌、1:9-12.

高橋芳幸、花田章(1984)イオノホアA23187で処理したウシ射出精子の体外における透明帯除去ハムスター卵への侵入、家畜繁殖誌、30:30-39.

Tervit, H. R., D. G. Whittingham and L. E. A. Rowson (1972) Successful culture in vitro of sheep and cattle ova. J. Reprod. Fert., 30:493-497.

Thibault, C., M. Gerard and Y. Menezo (1975) Preovulatory and ovulatory mechanisms in oocyte maturation. J. Reprod. Fert., 45:605-610.

Thompson, J. G. E., A. C. Simpson, P. A. Pugh, P. E. Donnelly and H. R. Tervit (1990) Effect of oxygen concentration on in-vitro development of preimplantation sheep and cattle embryos. J. Reprod. Fert., 89:573-578.

冨永敬一郎、福島護之、内海恭三、太田垣進、寺田邦光、金子史郎(1985)牛胚凍結に及ぼす諸要因.兵庫畜試研報、22:37-46.

冨永敬一郎、福島護之、太田垣進、山下弘昭、藤原義昭(1986)凍結胚移植の簡易化.兵庫畜試研報、23:50-59.

上田修二、大崎順子、山下滋貴、田口清実(1989)体外受精卵の現地移植.福岡農総試研報, C-9:19-24.

馬岡陽、野田洋一、松本央、岸淳二、辰巳賢一、森崇英(1989)低酸素濃度培養系におけるマウス2-cellブロック解除について.哺乳卵研誌,6:67-68.

内海恭三、星野崇詔、湯原正高、沖増栄治、住吉健也、猪八重悟(1980)牛凍結精子の膜電位と凍結能について：シアニン系色素による精子膜蛍光強度の測定、人工授精研誌、2

:84-87.

内海恭三、湯原正高(1974) ラット受精卵の凍結保存に関する研究、とくにドライアイスアルコールによる凍結保存について. 岡山大農学報、44:24-27.

Utsumi, K., H. Kato and A. Iritani (1991) Full-term development of bovine follicular oocytes matured in culture and fertilized in vitro. Theriogenology, 35:695-703.

Wright, R. W., Jr., G. B. Anderson, P. T. Cupps and M. Dorst (1976a) Successful culture in vitro of bovine embryos to the blastocyst stage. Biol. Reprod., 14:157-162.

Wright, R. W., Jr., G. B. Anderson, P. T. Cupps and M. Dorst (1976b) Blastocyst expansion and hatching of bovine ova cultured in vitro. J. Anim. Sci., 43:170-174.

Wright, R. W., Jr.(1977) Successful culture in vitro of swine embryos to the blastocyst stage. J. Anim. Sci., 44:854-858.

Xu, K. P., T. Greve, H. Callesen and P. Hyttel (1987a) Pregnancy resulting from cattle oocytes matured and fertilized in vitro. J. Reprod. Fert., 81:501-504.

Xu, K. P., R. Hoier and T. Greve (1987b) Dynamic changes of estradiol concentration in two culture systems for bovine oocyte maturation in vitro. Theriogenology, 27:297.

Xu, K. P. and T. Greve (1988) A detailed analysis of early events during in-vitro fertilization of bovine follicular oocytes. J. Reprod. Fert., 82:127-134.

STUDIES ON IN VITRO FERTILIZATION OF BOVINE FOLLICULAR OOCYTES
AND FREEZING EMBRYOS DERIVED FROM IVM-IVF OOCYTES

Moriyuki FUKUSHIMA

Present study was to establish the methods of in vitro fertilization of bovine follicular oocytes matured in culture, in vitro culture and freezing embryos.

The results obtained are summarized as follows:

I. Study on the culture condition which effects to the in vitro maturation of bovine follicular oocytes

1. The effects of gonadotropins and estradiol-17 β added into a maturation medium of bovine follicular oocytes in vitro on the subsequent capacity for fertilization and embryonic development

Effects of gonadotropins (LH and FSH) and estradiol-17 β (E_2) added into a maturation medium of bovine oocytes were evaluated for the subsequent capacity of in vitro fertilization and embryonic development into blastocysts after culture in the rabbit oviducts. The fertilization rates were between 88.2% and 90.9% and no significant difference could be found in each category ($P < 0.05$). In the case of the 4-cell embryos into blastocysts, the difference can be recognized between no additional and 10 μ g/ml LH, 1 μ g/ml E_2 and 2 μ g/ml FSH. However, the reason of these differences was not clear. As for the developmental rate into blastocysts,

no difference between each category could be recognized.

These results indicate that the addition of gonadotropins and E_2 into a maturation medium had no positive effect on the fertilization rate and embryonic development of bovine IVM oocytes when they were co-cultured with granulosa cells containing cumulus cells.

2. The effects of incubation temperature on the subsequent fertilizability and embryonic development of bovine oocytes matured and fertilized in vitro

The effect of incubation temperature on the subsequent fertilization rate and embryonic development of bovine IVM-IVF oocytes were examined. Although the tendency is different depending on bull spermatozoa, 39 °C was more effective than 37 °C on maturing and fertilizing temperature of bovine oocytes. Then, effects of incubation temperature by separating oocyte maturation and fertilization were examined. The fertilization rate was high when the culture was kept at 39 °C. The rate of embryonic development to the blastocyst stage could not be improved when they were matured at 37°C and changed to 39°C after insemination. Also when postinsemination was 37°C, the appearance of blastocysts was delayed by one day and the developmental rate was also low compared with the 39 °C situation. These results indicated that incubation temperature during maturation, for the sperm preincubation, and before and after insemination should be 39°C.

3. The effect of oxygen tension in the gas phase during maturation

process on the subsequent fertilizability and embryonic development of bovine oocytes

The effects of oxygen tension in the gas phase during maturation process on the in vitro maturation and the subsequent fertilization of bovine oocytes were investigated. The in vitro maturation rate for bovine oocytes was highest at 10% oxygen tension and decreased in the higher oxygen tension. The 35% oxygen tension was significantly ($P<0.05$) decreased maturation rate of 66.9% compared to those of others at 78.6 to 83.3%. Similar results were obtained for the monospermic fertilization rate. The rate of embryonic development after fertilization in actual measurement of oxygen tension of 13% was significantly higher compared with 20% oxygen tension ($P<0.05$).

II. Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa and effects of heparin and caffeine added into sperm pre-incubation medium on the subsequent fertilizability and embryonic development

1. Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa

Individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa was investigated comparatively. There was individual variation in the fertilizing rate. The individual with a low fertilization rate also had a low rate of beyond 4-cell stage embryos, and it appears that especially sperm from individuals whose fertilization was extremely

low (lower than 20%) should not be used for in vitro fertilization. There was no individual difference in the developmental ability to 4-cell stage of the fertilized embryos which were fertilized in vitro with sperms having different fertilizing abilities. This suggests that embryonic development after fertilization was not affected by factors of sperm due to the individual variation in the in vitro fertilizing ability of bull spermatozoa.

2. The effects of heparin and caffeine added into sperm pre-incubation medium on the subsequent fertilizability and embryonic development

The addition of heparin and caffeine significantly improved the fertilization rate and the developmental rate to the blastocyst stage ($P < 0.05$). This might be a reflection of the increase in the normal fertilization rate (monospermic fertilization rate) by both addition of heparin and caffeine. However, there is no synergistic effect by using both heparin and caffeine.

As for the final (18 hours insemination) fertilization rate, there was no difference between groups added with caffeine and heparin. However, it was revealed that in the process of early fertilization, penetration of heparin added sperm was quick and compared with that of caffeine added sperm, suggesting that heparin has more important role on capacitation and acrosome reaction than caffeine. It was also suggested that addition of heparin may be effective for the synchronized formation of male and female pronucleus, and consequently the embryonic development.

III Freezing bovine blastocyst stage embryos derived from IVM-IVF oocytes

1. The effects of culture condition on the subsequent freezability of bovine embryos derived from IVM-IVF oocytes and cultured in vitro or in the rabbit oviduct

Effect of culture condition on the subsequent freezability of bovine embryos derived from IVM-IVF oocytes and cultured in vitro or in the rabbit oviduct was investigated. Depending on the culture condition after in vitro fertilization, the quality of embryos is different and related to freezability of embryos. In vitro fertilization and cultivation blastocysts at present had low resistance to mechanical shock during the cooling for freezing, and the temperature to generate the solution effect at cooling period was high compared with blastocysts cultured in the rabbit oviduct. It had also a low physicochemical resistance to the dehydration and the concentrated salts after dehydration depending on the permeability of cell was low.

2. The effects of the cooling rate and liquid nitrogen plunging temperature on the subsequent post-thawing viability of bovine embryos derived from IVM-IVF oocytes and cultured in vitro

The effects of the cooling rate and plunging temperature in the liquid nitrogen on the subsequent viability of bovine embryos derived from IVM-IVF oocytes and cultured in vitro was investigated. The viability of embryos was high at -30°C (LN_2 plunging temperature) and was higher

compared with -33°C and -36°C categories at a cooling rate of $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minute}$, but on the other hand that of at $0.7^{\circ}\text{C}/\text{minute}$, -36°C was the best compared with others. At $0.5^{\circ}\text{C}/\text{minute}$, -33°C and -36°C were high compared with the other categories. In order to investigate the limit of dehydration when cooling at the rate of $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ the increase of the temperature from each was significantly reduced, due to the damage (solution effect) by excessive dehydration, when temperature was under -45°C .

The conception rate of post-thawing bovine embryos after transfer was compared in 4 categories including 3 different cooling curves which could get high viability rate; freezing curve to cooling of -36°C at $0.3^{\circ}\text{C}/\text{minute}$ usually used when freezing embryos derived from bovine (control category). Compared with the control category, the conception rate of the test category was improved. This viability of embryos showing the results of the incubation test can be used as an index of viability of embryos including conception capability. The total conception rate of the 3 categories were 54.3% (conception of 25 recipients out of 46) and the rate was not bad compared with embryos derived from donor cows.

3. Studies on frozen-thawed embryos derived from IVM-IVF oocytes with reference to the glycerol-removing methods in the straw

In order to apply the one-step glycerol dilution in straw to the field trials, the IVM-IVF embryos were frozen under the optimal conditions, and frozen-thawed embryos were transferred to the recipients to

examine their conception rate. It was indicated that a more than 50% conception rate was obtainable, and it was clarified that it is possible to do thawing and direct transfer of embryos in the field.

After this study, maturity of oocytes, preincubation treatment of sperm, and in vitro incubation condition can be considered as a factor related to the rate of embryonic development in bovine follicular oocytes. In order to get a high embryonic developmental rate, it is important to establish the optimum maturation condition and sperm preincubation condition. Also even if a high embryonic development rate was obtained, as for the freezability of embryos, incubation conditions after fertilization must have a large factor. Therefore, I believe that it is necessary to make clear and to improve the in vitro cultivation environment in the future.